



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD SALTILLO

**Efecto de nanopartículas de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 en la
simbiosis rhizobia-leguminosa durante las primeras
etapas fenológicas de soya, frijol y chícharo**

Tesis que presenta

César Roberto Sarabia Castillo

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía

Director:

Dr. Fabián Fernández Luqueño

Ramos Arizpe, Coah., noviembre 2016

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño a mi Mamá que me dio la vida y ha estado conmigo en todo momento y quien siempre me ha apoyado en todas y cada una de mis decisiones profesionales.

A mis hermanos Jonathan y Fernanda quienes siempre me apoyaron y creyeron en mí.

A mi papá Cruz Núñez quien nunca me dejó solo y me ha apoyado en todo.

A mi pequeño Mateo Sebastián quien siempre me alegra mis días y me dio ánimos para seguir adelante.

A Celia Rubio[†] quien tenía el mismo sueño que yo y estaba dispuesta a tomar este reto conmigo y hoy puedo decir que ambos lo hemos superado. Nunca te olvidare.

César R. Sarabia Castillo

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas y cada una de las personas que puso en mi camino.

A mis padres: Monserrat Castillo y Cruz Núñez por preocuparse por mi superación profesional y el gran apoyo que siempre me han brindado.

A mi familia en general gracias por nunca dejar de creer en mí.

Al Dr. Fabián Fernández Luqueño, director de tesis, por darme la oportunidad de trabajar en unos de sus proyectos de investigación. Gracias por su paciencia y ayuda en la realización de este trabajo; por sus consejos y por compartir conocimientos e ideas.

Al CINVESTAV unidad Saltillo, por la oportunidad que me brindo de realizar mis estudios de maestría.

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A mis compañeros de maestría Juan Carlos, Selvia, Dulze, Noé y Adriana Siller, quienes se convirtieron en grandes amigos y me hicieron sentir en familia, gracias por todo su apoyo y sus grandes consejos.

César R. Sarabia Castillo

Abreviaturas

CTL: Control

DDS: Días después de la siembra

FBN: Fijación biológica de nitrógeno

Fe₂O₃: Óxido de hierro

NMs: Nanomateriales

NPs: Nanopartículas

SRL: Simbiosis rizobia-leguminosa

TiO₂: Dióxido de titanio

UE: Unidad experimental

ZnO: Óxido de zinc

Glosario de términos

Clorofila: Pigmento de color verde que se halla presente en las hojas y tallos de muchos vegetales y que es responsable del proceso de fotosíntesis.

Fenología: es la ciencia que estudia la relación entre los factores climáticos y los ciclos de los seres vivos.

Fijación biológica de nitrógeno: proceso a través del cual microorganismos diazótrofos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable para las plantas.

Inóculo: Término colectivo para referirse a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped. El término también se usa para referirse a los organismos simbióticos o patógenos transferidos por cultivo.

Microorganismo diazótrofos: Microorganismos que tienen la capacidad de convertir N atmosférico en una forma útil biológicamente (amonio).

Morfología: En biología, la morfología es la disciplina encargada del estudio de la estructura de un organismo o sistema y sus respectivas características. Esto incluye aspectos de la apariencia externa (forma, color, estructura) así como aspectos de la estructura interna del organismo como huesos y órganos.

Nanomaterial: Es todo aquel material con al menos una de sus dimensiones inferior a los 100 nm.

Nanopartícula: es una partícula microscópica con por lo menos una dimensión menor que 100 nm.

Nódulos: Los nódulos radicales son estructuras producto de la asociación simbiótica entre bacterias y plantas superiores. La más conocida es la de *Rhizobium* con especies de Leguminosas. La planta proporciona a la bacteria compuestos carbonados como fuente de energía y un entorno protector y recibe nitrógeno en una forma utilizable para la formación de proteínas.

Simbiosis: Relación permanente y estrecha entre dos organismos que llevan una vida común, donde ambas especies se benefician en dicha relación. Normalmente esta relación es específica entre dos especies concretas, ya sean animales, plantas, hongos o bacterias.

Unidad SPAD: Es un valor proporcional al contenido de nitrógeno en plantas obtenido con un equipo SPAD Minolta 502.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
	2.1. Nanoparticulas (NPs).....	3
	2.2. Principales tipos de NMs.....	3
	2.3. Fuentes de generación de NPs.....	6
	2.4. Panorama de la producción/liberación de NMs.....	7
	2.5. Nanoparticulas en el ambiente.....	8
	2.6. Leguminosas	11
	2.6.1. Soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr)	11
	2.6.2. Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	14
	2.6.3. Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.).....	16
	2.7. Simbiosis rhizobia-leguminosa	18
III.	JUSTIFICACIÓN	21
IV.	HIPÓTESIS	21
V.	OBJETIVOS	22
	5.1. Objetivo general.....	22
	5.2. Objetivos específicos	22
VI.	METODOLOGÍA	23
	6.1. Materiales e infraestructura	23
	6.2. Ensayos experimentales.....	24
	6.2.1. Diseño experimental	24

6.2.2.	Unidades experimentales (UE)	26
6.2.3.	Manejo de las UE	26
6.3.	Preparación de solución nutritiva	27
6.4.	Preparación del inóculo bacteriano.....	28
6.5.	Colecta y análisis de datos.....	28
6.5.1.	Unidades SPAD.....	28
6.5.2.	Caracterización morfológica y nodulación.....	29
6.5.3.	Análisis estadístico	29
VII.	RESULTADOS.....	30
7.1.	Unidades SPAD del cultivo de soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr.).....	30
7.2.	Unidades SPAD del cultivo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	30
7.3.	Unidades SPAD del cultivo de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.).....	31
7.4.	Características morfológicas del cultivo de soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr.).....	35
7.5.	Características morfológicas del cultivo de frijol común (<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> L.).....	36
7.6.	Características morfológicas del cultivo de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	36
VIII.	DISCUSIONES.....	41
IX.	CONCLUSIONES.....	45
X.	PERSPECTIVAS	46
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las fuentes de generación de NPs.	7
Figura 2. Invasión de pelos radicales de leguminosas por <i>Rhizobium</i> sp. [63]. ...	20
Figura 3. Unidades SPAD en hojas de plantas de soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr.), cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones crecientes de nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃	32
Figura 4. Unidades SPAD en hojas de plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones crecientes de nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃	33
Figura 5. Unidades SPAD en hojas de plantas de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.), cultivas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones crecientes de nanopartículas de TiO ₂ , ZnO o Fe ₂ O ₃	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de NPs sobre plantas cultivadas.....	9
Tabla 2. Descripción de las etapas fenológicas durante las fases vegetativa y reproductiva de la soya [44].	13
Tabla 3. Descripción de las etapas fenológicas durante las fases vegetativa y reproductiva del frijol común.	15
Tabla 4. Descripción de las etapas fenológicas durante las fases vegetativa y reproductiva del chícharo [54].	17
Tabla 5. Materiales adquiridos para la realización del proyecto.	23
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas empleadas para regar los cultivos de frijol, soya y chícharo.....	24
Tabla 7. Diseño de tratamientos.	25
Tabla 8. Reactivos empleados en la preparación de dos litros de solución stock [64].	27
Tabla 9. Reactivos empleados para preparar un litro ^ϕ de medio de cultivo TY [66].	28
Tabla 10. Características de plantas de soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr.), cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones a concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO ₂ , ZnO o Fe ₂ O ₃	38
Tabla 11. Características de plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones a concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO ₂ , ZnO o Fe ₂ O ₃	39
Tabla 12. Características de plantas de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.) cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones a concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO ₂ , ZnO o Fe ₂ O ₃	40

RESUMEN

Actualmente se producen nuevos materiales con características especiales denominados nanomateriales y más particularmente nanopartículas (NPs). Éstas se liberan al medio ambiente sin que sea evaluado su potencial toxicológico sobre los sistemas ecológicos. En esta investigación se determinó el efecto de NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 , empleando concentraciones de 0, 3 y 6 g L^{-1} de agua, sobre la simbiosis rizobia-leguminosa en cultivos de soya, frijol y chícharo; cada uno con su respectivo par simbiote (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum*). Las semillas se sembraron y se inocularon con sus simbioses correspondientes 5 días después de la siembra (DDS) y se dejaron crecer durante 35 DDS. Durante este periodo de crecimiento, se determinó el efecto de las NPs sobre las unidades SPAD utilizando un medidor de clorofila Minolta SPAD-502 Plus®; además de analizar características morfológicas (longitud de raíz y parte aérea y pesos frescos y secos de la raíz y parte aérea) y crecimiento de nódulos simbioses en las plantas expuestas a NPs. La presencia de NPs modificó de manera significativa la morfología en los diferentes cultivos estudiados. Además se observó que la interacción simbiótica se afectó negativamente, lo que ocasionó el retraso de la formación de los nódulos y por consiguiente el inicio tardío de la fijación biológica de nitrógeno. Los resultados mostraron que el efecto de NPs es dependiente del tipo y concentración de estas y el tiempo de exposición, lo que significa que las NPs liberadas en el medio ambiente podrían afectar el desarrollo de los cultivos y algunos procesos biológicos importantes, tales como la fijación biológica de nitrógeno.

ABSTRACT

Currently new materials are produced with special features called nanomaterials and more particularly nanoparticles (NPs). These are released into the environment without being assessed their toxicological potential on ecological systems. In this research the effect of NPs TiO_2 , ZnO and Fe_2O_3 , at concentrations of 0, 3 and 6 gL^{-1} on rhizobia-legume symbiosis in soybeans, beans and peas was determined; each with its respective symbiont pair (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium etli*). The seeds were sown and inoculated with corresponding symbionts 5 days after sowing (DAS) and grown for 35 DAS. During this period of growth, the effect of NPs was determined on chlorophyll content using a Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502 Plus®; besides analyzing morphological characteristics (length and shoot and root fresh and dry weights of root and aerial part) and growth of symbionts nodules in plants exposed to NPs. The presence of NPs significantly altered morphology in different crops studied. It was further noted that the symbiotic interaction is negatively affected, causing the delay of the formation of nodules and therefore late onset of biological nitrogen fixation. The results showed that the effect of NPs is dependent on the type and concentration of these and the exposure time, which means that the NPs released into the environment could affect crop development and some important issues, such as fixing biological processes biological nitrogen.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las investigaciones científicas y desarrollos tecnológicos ligados con la nanotecnología impactan todos los sectores productivos, debido a que tienen múltiples y prometedoras aplicaciones. Entre las principales nanopartículas (NPs) empleadas en el desarrollo de productos de consumo, destacan las NPs a base de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 ; las cuales están presentes en productos como pinturas, tintas, plásticos, medicamentos, revestimientos, cremas solares y cosméticos, así como en aplicaciones biomédicas e insumos para la agricultura y la remediación ambiental.

Debido al aumento en la producción de nanomateriales (NMs), se ha planteado la necesidad de evaluar los riesgos potenciales asociados con su liberación al medio ambiente y sus interacciones con los organismos vivos. Por esta razón, se ha propuesto una nueva disciplina de investigación denominada nanotoxicología, dedicada al estudio de los efectos de la liberación de NMs sobre los seres vivos y el medio ambiente.

Por otro lado, los cultivos de soya (*Glycine max* [L.] Merr), frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum* L.), forman parte de la familia de las leguminosas y tienen importancia económica, cultural y nutricional en todo el mundo; ya que aportan un alto contenido de proteína y son fuente de alimento tanto para consumo humano como animal. Además, algunos de los cultivos como la soya, son aprovechados en aplicaciones industriales en la producción de aceites.

Así mismo, en los ecosistemas existen microorganismos de gran importancia ambiental como lo es el caso de los microorganismos diazótrofos, que se caracterizan por tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Estos microorganismos pueden ser de vida libre, o bien, pueden interactuar con algunas plantas y establecer una relación simbiótica con las mismas.

Entre las relaciones simbióticas más importantes se encuentra la que se da entre las rizobia y las plantas leguminosas, dando lugar a la fijación biológica del nitrógeno (FBN), el cual, es un proceso natural, que no contamina y que contribuye con el 13% del nitrógeno que requieren los cultivos en todo el mundo. Sin embargo, se ha reportado que muchos factores físicos, químicos y biológicos del suelo, así como diversos contaminantes, inhiben o reducen la FBN.

Esclarecer si los microorganismos sufren alguna afectación o no ante la presencia de NMs es una de las principales preocupaciones de la comunidad científica; por lo anterior, en esta investigación se evaluará el efecto de las NPs de mayor uso, que día a día se liberan a los ecosistemas, sobre la interacción simbiótica entre rizobia y leguminosas, que como se menciona anteriormente, es una pieza fundamental en la FBN.

Como principal característica de las interacciones simbióticas entre rizobia y leguminosas, está la formación de nódulos simbióticos en las raíces, por lo que, se ha planteado como objetivo de esta investigación caracterizar el efecto de NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 sobre la simbiosis de tres cepas microbianas y sus respectivos simbiontes. Se evaluará la formación y desarrollo de nódulos entre *Bradyrhizobium japonicum*-soya, *Rhizobium etli*-frijol común y *Rhizobium leguminosarum*-chícharo y se determinarán los cambios morfológicos de la plantas expuestas a NPs.

II. ANTECEDENTES

2.1. Nanoparticulas (NPs)

Las NPs consisten en conjuntos atómicos y moleculares que tienen dimensiones de escala nanométrica, *i.e.* en el intervalo de 1 a 100 nm, con formas, tamaños, propiedades de superficie, cristalinidad y reactividad química, que a menudo son diseñadas meticulosamente, haciéndolas llamar nanomateriales (NMs) artificiales [1], [2].

Por su lado la Comisión Europea en un documento citado por López-Peralta (2013), define a los nanomateriales como “*cualquier material natural o manufacturado que contiene partículas, en un estado sin consolidar o como un aglomerado, y en donde el 50% o más del tamaño de distribución de sus partículas se encuentran en dimensiones del rango de 1 a 100 nm*” por lo que se concluye que los NMs están compuestos de NPs, y que estas NPs representan la base de la materia nanoescalar [3] .

2.2. Principales tipos de NMs

En la actualidad, se conocen gran variedad de tipos de materiales, los cuales son nombrados principalmente por sus dimensiones y formas individuales *i.e.* se conocen como simples tubos, hilos, películas, esferas, barras, etc. y tienen por lo menos una dimensión en la nanoescala.

Por otro lado, las nanoparticulas son clasificadas generalmente en cuatro grupos de acuerdo a su morfología, estado de agregación, dimensionalidad y composición química [3].

De acuerdo a su morfología, las NPs se clasifican generalmente entre los aspectos altos y bajos en consideración del radio de las partículas, por lo que los altos aspectos radiales incluyen a los nanotubos y nanocables con gran variedad

de formas (zigzag, hélices, cinturones, etc.). Por otro lado las morfologías de los aspectos radiales pequeños incluyen esferas, óvalos, cubos, etc. [3].

En la clasificación de acuerdo a su estado de agregación, se tienen que tomar en cuenta las propiedades físicas y químicas. Éstas pueden existir en aerosoles, suspensiones o en un estado aglomerado debido a sus propiedades electromagnéticas, pudiéndose comportar como partículas dependiendo del tamaño del aglomerado [3].

La clasificación por su dimensionalidad, se basa principalmente en cuantas dimensiones en la nanoescala tiene un nanomaterial, por ejemplo en 1D, que son materiales con solo una dimensión en la escala nanométrica, en 2D, se agrupan los materiales que poseen dos dimensiones en la escala nanométrica y los 3D, abarca a aquellos materiales en las que sus tres dimensiones corresponden a la nanoescala [3], [4].

Con base en su composición química, las NPs pueden estar formadas ya sea por un único elemento químico o bien, pueden estar formadas por un compuesto; y esta clasificación a su vez se subdivide en: i) NPs basadas en carbono, ii) puntos cuánticos, iii) NPs metálicas y iv) NPs de óxido de metal, siendo estas últimas, el tipo de nanopartículas que son parte de esta investigación.

Las NPs basadas en carbono son nanomateriales (NMs) cuyo componente mayoritario es el carbono, las cuales pueden adoptar formas de tubos, elipsoides y esferas huecas, siendo estos dos últimos los denominados fullerenos, mientras que los tubos reciben el nombre de nanotubos [5].

Los puntos cuánticos son cristales semiconductores compuestos de elementos de los grupos II-VI, III-V, IV-VI; de la tabla periódica de forma habitualmente esférica. Su característica esencial es que los electrones que lo constituyen están obligados a mantenerse confinados en las tres dimensiones, lo que genera diversos fenómenos cuánticos [6], [7].

Las NPs metálicas son generalmente esféricas, cuya obtención ha sido un área muy activa de investigación, destacando entre ellas a las NPs de metales nobles como el oro, la plata, platino y paladio, ya que presentan excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño [5].

Las NPs de óxidos de metal representan un área de interés en la química de materiales debido a las potenciales aplicaciones tecnológicas de estos compuestos. Los elementos metálicos tienen la capacidad de formar una gran diversidad de compuestos de óxido, los cuales pueden adoptar diferentes formas geométricas, así como una estructura electrónica que los puede hacer exhibir un carácter metálico, semiconductor o aislante. Ejemplo de estas estructuras destacan el TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 [8] [9].

Las NPs de TiO_2 tienen una amplia gama de aplicaciones comerciales, especialmente en productos de consumo diario como es el caso de protectores solares, cosméticos, nano-recubrimientos, baterías etc. Este incremento en el uso industrial de NPs de TiO_2 , implica a su vez, un aumento en la liberación directa o indirecta de este tipo de NMs hacia el medio ambiente; pudiendo causar toxicidad para los organismos vivos o el medio ambiente [10]. Sadiq *et al.* (2011) demostraron que las NPs de TiO_2 disminuyeron significativamente el contenido de clorofila en dos géneros de microalgas (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.) e inhibieron significativamente su crecimiento, comparado con el tratamiento control [11]. De igual manera, Ji *et al.* (2011) concluyeron que las NPs basadas en óxidos metálicos forman agregados que atrapan a las células de algas, pudiendo contribuir a la inhibición del crecimiento de las mismas [12]. Además, el uso de NPs de TiO_2 en dispositivos, alimentos y productos ha incrementado la preocupación por el posible impacto ambiental que éstas pudieran ocasionar. Por esta razón, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha listado estas NPs como uno de los NMs

prioritarios para la realización de pruebas de ecotoxicidad inmediata, debido a su detección en aguas residuales, suelos y aguas superficiales [13].

Las NPs a base de óxido de zinc son de las más empleadas en términos de cantidades de producción comercial, por lo que representan una de las principales fuentes de NPs introducidas en los productos de consumo disponibles en el mercado. Las NPs de ZnO se emplean en filtros solares, pigmentos, semiconductores, aplicaciones industriales, etc. Sin embargo, como consecuencia de la liberación de NMs y la preocupación de científicos y tecnólogos, se han documentado diversos estudios acerca de los efectos peligrosos de las NPs de ZnO sobre la salud humana y ecológica. Se ha reportado que las NPs de ZnO pueden causar daño oxidativo a las células bacterianas como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Vibrio fischeri*; ocasionando la degradación de la membrana celular, por lo que las NPs de ZnO resultan ser más tóxicas que las NPs de TiO₂ [14], [15], [16].

Las NPs a base de hierro exhiben diferentes cualidades intrínsecas como su capacidad para ser utilizadas en gran número de aplicaciones industriales, destacando su utilización en soportes de grabación debido a sus propiedades paramagnéticas, así como para la formación de imágenes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI) [17], en el suministro de medicamentos [18], como biosensor en el diagnóstico de la anemia [19] y en sistemas de calidad de alimentos [20]. Sin embargo, a pesar de las propiedades de las NPs de hierro, poco se sabe acerca de los efectos de estos NMs sobre el medio ambiente [21], [22].

2.3. Fuentes de generación de NPs

Las fuentes de NPs pueden ser clasificadas principalmente como fuentes naturales o fuentes antropogénicas, las cuales a su vez se dividen en fuentes intencionales y accidentales, como se puede apreciar en la Figura 1.

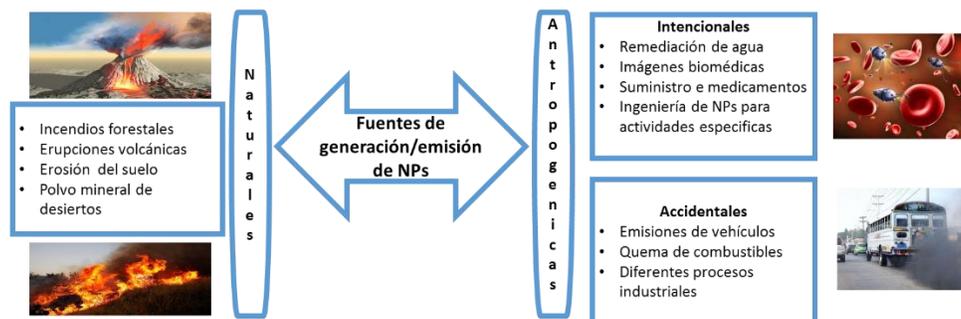


Figura 1. Clasificación de las fuentes de generación de NPs.

2.4. Panorama de la producción/liberación de NMs

En la actualidad, la nanotecnología es una de las tecnologías más prometedoras y de más rápido crecimiento, por lo cual, la producción de NMs artificiales ha ido en aumento de manera constante en los últimos años, existiendo ya en el mercado muchos productos desarrollados a partir de NMs artificiales en todo el mundo [23], [24].

Sin embargo, cabe destacar que no se cuenta con información acerca de las cantidades reales de NMs artificiales que se producen o liberan al medio, por lo que esto representa un obstáculo en la evaluación de los posibles riesgos para el medio ambiente. Por esta razón, se ha recurrido a la utilización de modelos probabilísticos, en donde se toma en cuenta la variabilidad de los datos de diferentes fuentes, así como el ciclo de vida de los productos, para poder proporcionar una estimación aproximada acerca de la producción de NMs. Un ejemplo claro de esto es un estudio realizado por Keller *et al.* (2013), en el cual calcularon la emisiones de NMs a partir de 2010, en donde hacen una estimación de que entre el 63 y 93% de las más de 260,000-309,000 toneladas de NPs producidas anualmente están siendo finalmente dispuestas en rellenos sanitarios y el resto son liberadas en suelo, cuerpos de agua y la atmósfera; los autores indican que existe incertidumbre en las estimaciones realizadas pero, estas pueden mejorar a medida que se disponga de mejores datos sobre la producción y liberación de NMs [24].

2.5. Nanopartículas en el ambiente

A pesar de las ventajas que los NMs ofrecen en diversas aplicaciones y el constante incremento en sus volúmenes de fabricación, actualmente sus implicaciones ambientales no son entendidas completamente, por lo cual, algunos grupos de investigación han iniciado a evaluar los potenciales efectos adversos de las NPs sobre el medio ambiente, así como el comportamiento de las NPs en los ecosistemas y su ecotoxicología [24], [25].

Por otro lado, se estima que entre el 63 y 91% de los NMs producidos en 2010 terminaron en vertederos, entre el 8 y 28% se liberaron a los suelos, del 0.4 al 7% terminaron en cuerpos de agua y del 0.2 al 1.5% fueron emitidas hacia la atmosfera. El sílice (SiO_2), óxido de titanio (TiO_2), óxidos de hierro o zinc, y alúmina (Al_2O_3) son los NMs artificiales que más se producen en la actualidad, de los cuales el TiO_2 y los óxidos de hierro y zinc son los que con mayor frecuencia se liberan sobre el suelo, agua y aire [24].

La liberación de NPs en el medio ambiente, a causa de las actividades antropogénicas, se ha convertido en una seria amenaza para el sistema ecológico incluyendo a las plantas. Sin embargo, se han reportado estudios que evidencian los efectos positivos y negativos de las NPs en las plantas superiores, los cuales se basan en su mayoría, en pruebas de porcentaje de germinación de semillas y elongación de raíz, donde se evalúan los efectos en la morfología de plantas cultivadas expuestas a diferentes concentraciones de NPs (Tabla 1). Sin embargo, los organismos vivos responden diferencialmente a la presencia de NPs en función del tipo de NP, concentración, forma y periodo de contacto. Por esta razón, diferentes grupos de investigación alrededor del mundo realizan investigaciones para determinar el efecto de diversos nanomateriales, a diferentes concentraciones, sobre diferentes sistemas biológicos [26], [27].

Tabla 1. Efectos de NPs sobre plantas cultivadas.

Planta cultivada	Tipo de NPs	Concentración	Efectos	Referencia
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	Nano-ZnO	0.1-10 g L ⁻¹	Disminución en el peso fresco, longitud y diámetro de tallos y raíces.	[30]
Arbejon (<i>Vicia narbonensis</i> L.)	Nano-TiO ₂	0.2-4.0% en volumen	Disminución significativa en el índice de vigor de las plantas.	[31]
Arroz (<i>Oriza sativa</i> L.)	Nano-CuO	0.5, 1.0 y 1.5 mM	Disminución en el porcentaje de germinación de semillas, así como una reducción en la longitud y peso de raíces y brotes de las plantas.	[32]
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	Nano-CuO	0.5, 1.0 y 1.5 mM	Disminución en la longitud y peso fresco de los brotes, así como disminución en la elongación de las raíces.	[33]
Col china (<i>Brassica pekinensis</i> L.)	Nano-ZnO	0.001-0.08 g L ⁻¹	No presentó efectos negativos en las tasas de germinación, pero inhibió significativamente la elongación de la raíz y brotes de las plántulas.	[34]
Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Nano-CeO ₂	0.5 g L ⁻¹	No se observaron efectos en el rendimiento de las plantas.	[35]
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.)	Nano-CuO	0.5 g L ⁻¹	Se observaron cambios morfológicos en el brote y crecimiento de la raíz, además de la reducción de la longitud y peso de la raíz.	[36]
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Nano-ZnO	1 g L ⁻¹	No tuvo efecto negativo en la germinación de semillas, pero si presentó inhibición significativa en la longitud de la raíz.	[37]

Continuación...

Mijo perla (<i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R.Br.)	Nano-Ag	0.02 y 0.05 g L ⁻¹	Mejoró la germinación de semillas con respecto al control.	[26]
Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.)	Nano-ZnO	1 g L ⁻¹	Sin efectos significativos en la germinación pero hubo reducción en el crecimiento de las raíces.	[37]
	Nano-ZnO	0.5-4 g L ⁻¹	Sin efectos significativos en la germinación pero redujo la elongación de la raíz	[38]
Soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr)	Nano-CeO ₂	0.5-4 g L ⁻¹	No presentó efecto significativo en la germinación y además aumentó significativamente la elongación de la raíz.	[38]
	Nano-Al ₂ O ₃	5-50 g L ⁻¹	Reduce significativamente la elongación de las raíces.	[39]

2.6. Leguminosas

Las leguminosas son plantas de la familia Fabaceae que se pueden encontrar en todos los continentes, además de tener la capacidad de crecer en diversos ambientes bajo diferentes condiciones climáticas y edáficas. La familia Fabaceae es la tercera más grande de plantas con flores, con 800 géneros y 20,000 especies diferentes, dentro de las cuales se incluyen especies económicamente importantes, así como de alto valor alimenticio como el frijol, soya y chícharo [13], [28].

Las semillas de leguminosas son el segundo grupo alimenticio en importancia para humanos y animales después de los cereales y son de dos a tres veces más ricas en proteína que estos. Algunas leguminosas como la soya son cultivadas con fines industriales y usados principalmente para la extracción de aceite y la alimentación humana o animal [29].

2.6.1. Soya (*Glycine max* [L.] Merr)

La soya es una planta de la familia Fabaceae, la cual está considerada entre los principales cultivos de importancia mundial por su gran cantidad de usos que se deriva de su alto contenido de proteína y calidad de aceite. Dentro de sus aplicaciones, destaca la producción de aceite para consumo humano y la harina usada para la elaboración de alimentos balanceados para animales domésticos [40], [41]. Por lo anterior, la producción de soya a nivel mundial ha crecido un 13.6%, al pasar de 220 a 250 millones de toneladas, cuya producción se concentra principalmente en Estados Unidos, Brasil, China, México, entre otros países [40].

En México, el cultivo de esta leguminosa se siembra en una superficie de 75,241 ha aproximadamente. Esta producción, se distribuye principalmente en el sur de Tamaulipas, Chiapas, San Luis Potosí, Veracruz, Campeche,

Chihuahua y Jalisco, produciendo cerca de 152 283 Ton anuales, las cuales solo abastecen el 3 % de la demanda nacional, por lo que México es considerado el cuarto importador de soya a nivel mundial; importando el 4.5% de la soya comercializada a nivel mundial. Esto equivale a 3.5 millones de toneladas de soya, de las cuales el 98 % se destina al sector pecuario [40], [42].

Por otro lado, las plantas de soya pueden alcanzar hasta 80 cm de altura y su ciclo de crecimiento puede oscilar de entre tres a siete meses. Su desarrollo se divide en fase vegetativa y reproductiva, las cuales a su vez se subdividen en etapas de desarrollo bien definidas (Tabla 2). La soya puede adaptarse a una gran variedad de latitudes que van desde 0 a 38 grados y altitudes de hasta los 1000 metros [43].

Tabla 2. Descripción de las etapas fenológicas durante las fases vegetativa y reproductiva de la soya [44].

Fase	Etapas fenológicas	Denominación	Descripción
Vegetativa	VE	Emergencia	Los cotiledones se encuentran a nivel del suelo.
	VC	Cotiledón	Las hojas cotiledonales están abiertas.
	V1	Primer nudo	Se localiza donde se originan las hojas unifoliadas.
	V2	Segundo nudo	Se localiza donde se origina la primera hoja trifoliada.
	V3	Tercer nudo	Se localiza donde se origina la segunda hoja trifoliada.
	Vn	Eneavo nudo	n. número de nudos en el tallo principal.
Reproductiva	R1	Inicio de floración	Primera flor abierta en cualquier nudo
	R2	Plena floración	Flor abierta en alguno de los dos nudos superiores
	R3	Principio de formación de vaina	Vainas de 0.5 cm en alguno de los dos nudos superiores
	R4	Llenado de vaina	Vainas de 2 cm en alguno de los 4 nudos superiores
	R5	Inicio de formación de semillas	Vainas con granos
	R6	Tamaño máximo de semillas	Vainas de color verde intenso en alguno de los dos nudos superiores
	R7	Inicio de maduración	La vaina empieza a tomar un color amarillo
	R8	Plena madurez	Vaina seca de color gris o café

2.6.2. Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Es una especie originaria del área México-Guatemala, donde es posible encontrar cultivares silvestres o domesticados (cultivados). El frijol es una de las legumbres más consumidas en todo el mundo y por lo tanto es considerado un cultivo valioso y uno de los más importantes en términos de su valor económico y nutricional. Tiene un contenido elevado de compuestos bioactivos como oligosacáridos, taninos, antocianinas, ácido fítico, inhibidores de proteasas, lectinas, daizeina y genisteína; además de ser una fuente de proteínas, fibra dietética, carbohidratos, vitaminas y minerales [45], [46], [47].

A nivel mundial, los principales países productores de frijol son Brasil, India, Myanmar, China, México y Estados Unidos; siendo en México la base de la alimentación, haciéndolo ser un cultivo de suma importancia socioeconómica [48].

Por lo anterior, la Ley de Desarrollo Rural Sustentable lo define como un producto básico y estratégico para el país, ya que se siembra en todas las regiones agrícolas, ocupando el segundo lugar en superficie, con un promedio de 1.6 millones de hectáreas cosechadas, produciendo alrededor de 1.1 millones de toneladas, con un valor de 10.2 millones de pesos, lo que equivale al 3.1% del valor de la producción agrícola. Por estas razones este cultivo tiene gran importancia, además de que cuenta con 617 829 mil unidades productoras, en las cuales se generan un total de 78 millones de jornales que equivalen a 382 mil empleos permanentes [48], [49].

Por otro lado, de manera general, el desarrollo de la planta de frijol comprende dos fases sucesivas: la vegetativa y la reproductiva. La fase vegetativa inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones para germinar y termina cuando aparecen los primeros botones florales. Por otro lado, la fase reproductiva se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos

florales y termina cuando los granos presentan el grado de madurez necesario para su cosecha.

Durante las fases vegetativa y reproductiva es posible identificar diez etapas de desarrollo muy bien definidas, las cuales se describen en la Tabla 3 [50].

Tabla 3. Descripción de las etapas fenológicas durante las fases vegetativa y reproductiva del frijol común.

Fase	Etapas fenológicas	Denominación	Descripción
Vegetativa	V0	Germinación	La semilla está en condiciones favorables para iniciar la germinación.
	V1	Emergencia	Los cotiledones aparecen al nivel del suelo.
	V2	Hojas primarias unifoliadas	Las hojas primarias de la planta se encuentran desplegadas.
	V3	Primera hoja trifoliada	La primera hoja trifoliada de la planta está desplegada.
	V4	Tercera hoja trifoliada	Presencia de la tercera hoja trifoliada totalmente desplegada.
Reproductiva	R5	Prefloración	Las plantas presentan el primer racimo en cualquier nudo sobre el tallo principal.
	R6	Floración	Presencia de la primera flor abierta.
	R7	Formación de vainas	Las plantas presentan la primera vaina con corola de la flor colgada o desprendida.
	R8	Llenado de vainas	Presencia de la primera vaina llena, con granos de tamaño completo.
	R9	Maduración	Presencia de la primera vaina decolorada y seca, amarillamiento y pérdida de hojas.

2.6.3. Chícharo (*Pisum sativum* L.)

El chícharo o guisante, es una especie anual perteneciente a la familia Fabaceae, muy utilizada en todo el mundo, ya que es una excelente fuente de proteínas, fibra, carbohidratos, vitaminas y minerales. Esta planta tiene la ventaja de que se puede cosechar entre los 90 y 120 días después de la siembra, por lo que se puede consumir en forma de hortaliza fresca y como grano [51].

En México, el cultivo de chícharo se presenta como una alternativa en la agricultura debido a que en zonas de temporal el cultivo de chícharo aprovecha de mejor manera los recursos hídricos y edáficos [52].

Por otro lado, en nuestro país, el chícharo es cultivado en 19 estados, de los cuales el Estado de México es considerado el primer estado productor de chícharo con una cosecha de 32 mil toneladas anuales, ocupando una superficie de cultivo de 7 200 hectáreas, así mismo el estado de Puebla ocupa el segundo lugar en producción anual con 18 037 toneladas, con una superficie cosechada de 3 605 hectáreas [52], [53].

Por lo anterior, los productores mexicanos de chícharo, tienen oportunidad de negocios en diferentes mercados del mundo, debido a que el chícharo tiene gran demanda en países como Chile, Canadá, así como en toda la Unión Europea. Por esta razón, es importante incursionar en esos mercados con la finalidad de ser un proveedor permanente de este producto [52].

Por otro lado, y de manera general, es importante tener en cuenta el desarrollo de la planta de chícharo, el cual se divide en dos fases, la vegetativa y la reproductiva, en las cuales se pueden identificar etapas de desarrollo bien definidas características del crecimiento de esta planta, las cuales se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de las etapas fenológicas durante las fases vegetativa y reproductiva del chícharo [54].

Fase	Etapas fenológicas	Denominación	Descripción
Vegetativa	V0	Germinación	Aparecen el hipocótilo y la radícula, que empiezan a crecer; el primero hacia la superficie y el otro en sentido contrario. Los cotiledones no salen a la superficie debido a que el hipocótilo no se alarga.
	V1	Formación de hojas verdaderas	Se desarrollan el primer par de hojas verdaderas a la vez que se desprenden los cotiledones.
	V2	Desarrollo vegetativo	Posterior al desarrollo de las hojas verdaderas, se forman los nudos vegetativos y el tallo principal comienza a ramificarse a partir del segundo nudo.
Reproductiva	R1	Botón floral	Se observan los primeros botones florales en la parte superior del tallo de la planta.
	R2	Floración	Momento en que se abren las primeras flores.
	R3	Fructificación	Las vainas alcanzan alrededor de 1 cm de largo, los pétalos se marchitan y caen.
	R4	Maduración	Las vainas están llenas y las semillas toman el color típico de la variedad. Las partes inferiores de la planta empiezan a marchitarse y cambian su color a amarillo, las partes superiores de la planta aún están verdes.

2.7. Simbiosis rhizobia-leguminosa

La simbiosis, en general, es una interacción entre dos especies, donde la asociación resulta en una relación mutuamente beneficiosa. Las plantas a menudo utilizan interacciones simbióticas con hongos o bacterias para permitir un proceso de nutrición más eficiente. Por ejemplo, las plantas de la familia Fabaceae, incluyendo frijol, soya y chícharo, realizan una interacción simbiótica con bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae, lo que le permite a la planta cubrir sus necesidades de nitrógeno cuando es escaso en el suelo [55]. En otras palabras, esta simbiosis aporta a la planta nitrógeno inorgánico [56] a través del proceso natural denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN). La FBN contribuye anualmente con 39 millones de Ton de nitrógeno a escala global, mientras que más de 130 millones de Ton de fertilizante nitrogenado se emplean cada año en suelos cultivables [57]. Durante la FBN, un órgano facultativo denominado nódulo es desarrollado por la planta en el sistema de raíces o tallos, el cual alberga millones de rhizobia [58].

Debido a que las rhizobias además de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas también favorecen el desarrollo de las plantas. Éstas bacterias se han considerado miembros de un conjunto de microorganismos denominados rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), las cuales actualmente incluyen decenas de géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, etc., que promueven el crecimiento de plantas mediante el aumento de la disponibilidad de nutrientes y la mejora de la absorción de nitrógeno, fósforo y otros minerales [59].

La simbiosis rhizobia-leguminosa, es un proceso altamente coordinado para el intercambio molecular en el suelo entre las bacterias nodulantes de la raíz y la leguminosa. Las leguminosas inician esta relación simbiótica mediante la liberación, vía raíz, de ciertos compuestos llamados flavonoides [60]; metabolitos secundarios biológicamente activos de bajo peso molecular, que

conforman un grupo diverso de compuestos entre los que destacan las flavonas, flavonoles e isoflovanoides. Los isoflovanoides, por ejemplo, han sido ampliamente reportados por participar en las interacciones simbióticas, limitándose principalmente a las leguminosas, actuando como inductores de un gen de nodulación [61].

La formación y desarrollo de los nódulos, es un proceso multipasos que consiste en el reconocimiento de las plantas hospederas por las bacterias, la unión de dichas bacterias al pelo de la raíz, el rizado del pelo de la raíz, la formación del hilo de infección y el desarrollo de nódulos [62].

En este proceso existen por lo menos dos conjuntos de señales simbióticas entre las leguminosas y las rhizobia. Las raíces, como se mencionó anteriormente, secretan flavonoides que se acumulan en la rizósfera de la planta huésped. Estos flavonoides son detectados por las bacterias, haciéndolas avanzar a la rizósfera dando lugar ‘al cortejo bioquímico’. Los flavonoides activan las proteínas NodD dando lugar a la formación de un complejo flavonoide-NodD, el cual actúa como un regulador de la transcripción de los genes de nodulación, teniendo como resultado la secreción de factores Nod [62]; los cuales conforman el segundo conjunto de señales que causan la inducción de diversos cambios bioquímicos y morfológicos, haciendo que el pelo de la raíz se deforme y se encrespe con la finalidad de atrapar las rhizobias presentes en la rizósfera. Las rhizobias atrapadas empiezan a infectar la raíz mediante un conducto llamado hilo de infección, mediante el cual, las rhizobias entran a la corteza de la raíz para formar los primordios del nódulo. El hilo de infección, se dirige entonces hacia estos primordios del nódulo en formación. Las rhizobias en ellos se dividen varias veces y se transforman en bacteroides que quedan rodeados por una membrana bacteriana denominada peribacteroidal; teniendo como resultado la formación de los nódulos. En la Figura 2 se describen los pasos del proceso de formación de los nódulos [61], [62].

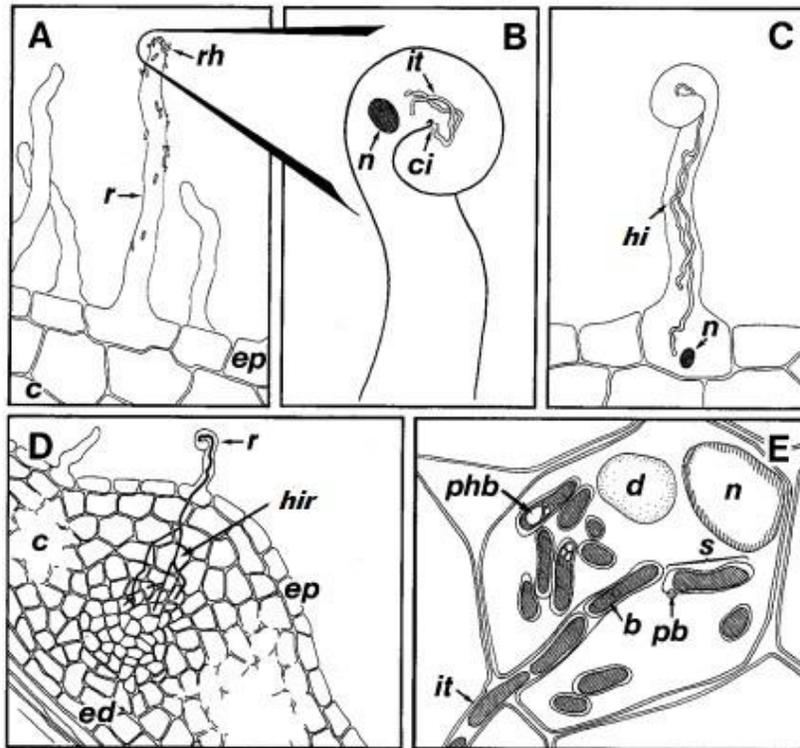


Figura 2. Invasión de pelos radicales de leguminosas por *Rhizobium* sp. [63].

(A) rizobia (rh) se adhiere al pelo radical (r). (B) “Factores Nod” inducen el rizado del pelo radical y permiten la penetración bacteriana al centro de infección (ci) precediendo el crecimiento del hilo de infección (hi). (C) El (hi) alcanza la base del pelo radical. (D) (r) se ramifica cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) Los bacteroides (b) son liberados desde (hi) y forman simbiosomas (s) donde se acumulan gránulos de polyhidroxibutarato (phb) rodeados por la membrana peribacteroidal (pb). Otras abreviaturas: c, corteza; d, vacuola digestiva; ep, epidermis; ed, endodermis.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la producción de NMs ha ido en aumento en los últimos años y que su liberación al medio ambiente no está siendo controlada de manera eficiente, se tiene la necesidad de realizar investigaciones acerca de los impactos ecológicos que las NPs pudieran ocasionar a los sistemas biológicos.

Por esta razón, la presente investigación se centra principalmente en evaluar el efecto de NPs de óxidos metálicos sobre la interacción simbiótica de rizobia-leguminosa, que tiene como beneficio la fijación biológica de nitrógeno.

Por este motivo se estudiarán los efectos de las NPs sobre la simbiosis de i) *Bradyrhizobium japonicum*-soya (*Glycine max* [L.] Merr), ii) *Rhizobium etli*-frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y iii) *Rhizobium leguminosarum*-chícharo (*Pisum sativum* L.). Estos sistemas biológicos se caracterizarán durante sus primeras semanas de vida, se les determinará la cantidad de nódulos producidos durante la simbiosis y se evaluará si las NPs les causan algún daño.

IV. HIPÓTESIS

Las NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 afectan las interacciones simbióticas entre leguminosas y rizobia al reducir el número de nódulos activos y alterar el crecimiento y desarrollo de plántulas.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el efecto de NPs de TiO₂, ZnO y Fe₂O₃ sobre la simbiosis de tres cepas microbianas y sus respectivos simbiontes (soya, frijol y chícharo).

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el número de nódulos activos durante las simbiosis: *i*) *Bradyrhizobium japonicum*-soya (*Glycine max* [L.] Merr), *ii*) *Rhizobium etli*-frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y *iii*) *Rhizobium leguminosarum*-chícharo (*Pisum sativum* L.).
- Identificar el daño potencial de las NPs sobre la función y sobrevivencia de los nódulos de soya, frijol común y chícharo.
- Caracterizar el efecto de las NPs sobre la fotosíntesis, durante la simbiosis *B. japonicum*-soya, *R. etli*-frijol común y *R. leguminosarum*-chícharo.
- Caracterizar el efecto de las NPs sobre el desarrollo morfológico de las plantas durante la simbiosis *B. japonicum*-soya, *R. etli*-frijol común y *R. leguminosarum*-chícharo.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Materiales e infraestructura

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Interacciones Ambiente Planta y en un invernadero tipo capilla, ubicado en las instalaciones del Cinvestav Unidad Saltillo. Los materiales empleados se describen en la Tabla 5. Las características de las nanopartículas empleadas se describen en la Tabla 6.

Tabla 5. Materiales adquiridos para la realización del proyecto.

Material	Procedencia
Semillas de soya (<i>Glycine max</i> (L.) Merr)	Campo experimental “Las Huastecas”, INIFAP-Tamaulipas
Semillas de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	INIFAP-Saltillo
Semillas de chicharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	Semillas comerciales producidas en el rancho Los Molinos, Tepoztlán Mor.
Bacterias simbiotes (<i>B. japonicum</i> , <i>R. etli</i> y <i>R. leguminosarum</i>)	Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV del IPN, Unidad Zacatenco
Sustrato (Vermiculita)	Marca comercial Vermilita®
Nanopartículas (TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃)	ID-nano (Investigación y Desarrollo de Nanomateriales S.A. de C.V., San Luis Potosí, S.L.P., México), cuyas características se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas empleadas para regar los cultivos de frijol, soya y chícharo.

Característica	Dióxido de Titanio	Óxido de Zinc	Óxido de Hierro
Formula	TiO ₂	ZnO	α -Fe ₂ O ₃
Fase de óxido	Anatasa	Wurtzita	Hematita
Estructura cristalina	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Color	Blanco	Marfil	Ocre
Peso molecular (g mol ⁻¹)	79.86	81.40	159.69
Tamaño de partícula (nm)	<50	<50	80-94
Punto de fusión (°C)	1843	1975	1565
Densidad (g cm ⁻³)	4.230	5.606	5.420

6.2. Ensayos experimentales

6.2.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar. Se realizaron 6 repeticiones, siendo un total de 42 unidades experimentales (UE). Los tratamientos se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Diseño de tratamientos.

Experimento	Codificación	Descripción
<i>Soya + B. japonicum</i>	Ti3	Acondicionado con NPs de TiO ₂ a concentración de 3 g L ⁻¹
	Ti6	Acondicionado con NPs de TiO ₂ a concentración de 6 g L ⁻¹
	Zn3	Acondicionado con NPs de ZnO a concentración de 3 g L ⁻¹
	Zn6	Acondicionado con NPs de ZnO a concentración de 6 g L ⁻¹
	Fe3	Acondicionado con NPs de Fe ₂ O ₃ a concentración de 3 g L ⁻¹
	Fe6	Acondicionado con NPs de Fe ₂ O ₃ a concentración de 6 g L ⁻¹
	CTL	Control
<i>Frijol + R. etli</i>	Ti3	Acondicionado con NPs de TiO ₂ a concentración de 3 g L ⁻¹
	Ti6	Acondicionado con NPs de TiO ₂ a concentración de 6 g L ⁻¹
	Zn3	Acondicionado con NPs de ZnO a concentración de 3 g L ⁻¹
	Zn6	Acondicionado con NPs de ZnO a concentración de 6 g L ⁻¹
	Fe3	Acondicionado con NPs de Fe ₂ O ₃ a concentración de 3 g L ⁻¹
	Fe6	Acondicionado con NPs de Fe ₂ O ₃ a concentración de 6 g L ⁻¹
	CTL	Control

Chícharo + <i>R. leguminosarum</i>	Ti3	Acondicionado con NPs de TiO ₂ a concentración de 3 g L ⁻¹
	Ti6	Acondicionado con NPs de TiO ₂ a concentración de 6 g L ⁻¹
	Zn3	Acondicionado con NPs de ZnO a concentración de 3 g L ⁻¹
	Zn6	Acondicionado con NPs de ZnO a concentración de 6 g L ⁻¹
	Fe3	Acondicionado con NPs de Fe ₂ O ₃ a concentración de 3 g L ⁻¹
	Fe6	Acondicionado con NPs de Fe ₂ O ₃ a concentración de 6 g L ⁻¹
	CTL	Control

6.2.2. Unidades experimentales (UE)

Cada UE de los ensayos experimentales consistió en una maceta de plástico tipo vivero de 10.1 × 9.3 × 7.1 cm (Ø superior × altura × Ø inferior, respectivamente), la cual se llenó con 60 g de vermiculita y se saturó con agua común.

6.2.3. Manejo de las UE

Tres días posteriores a la saturación con agua común, en cada UE se realizó la siembra de tres semillas de soya a 1.5 cm de profundidad, distribuidas uniformemente en el área de la maceta. Cada UE se regó al momento de la siembra y posteriormente se realizaron riegos cada 5 días con suspensiones de NPs de TiO₂, ZnO u Fe₂O₃, a concentraciones de 0, 3 y 6 g L⁻¹ hasta completar un volumen de 500 mL. Diez días después de la siembra (DDS) se realizó un raleo para dejar una plántula por cada UE y se aplicaron 10 mL de inóculo de la cepa de *B. japonicum* en la base del tallo de cada plántula.

Para las UE correspondientes a los cultivos de frijol común y chícharo se siguió la metodología anterior, salvo que el inóculo empleado fue *R. etli* y *R. leguminosarum* respectivamente.

Las plantas de cada UE se cultivaron en invernadero durante 35 DDS. Durante el cultivo de las plantas, se aplicaron riegos posteriores a los 10 y 20 días con las suspensiones de NPs previamente indicadas, a las concentraciones de 0, 3 y 6 g L⁻¹, según correspondió con el diseño de tratamientos (Tabla 7). Además, se realizaron riegos adicionales con solución nutritiva de acuerdo con las necesidades del cultivo. La solución nutritiva se describe en la siguiente sección.

6.3. Preparación de solución nutritiva

La solución nutritiva se preparó mezclando Ca(NO₃)₄·4H₂O (2.30 g), MgSO₄·7H₂O (16.36 g), CaSO₄·2H₂O (14.25 g), K₂SO₄ (18.00 g), NaFeEDTA (0.65 g), Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O (3.18 g) y 10 mL de solución stock en 50 L de agua destilada; los reactivos de la solución stock se especifican en la Tabla 8 [64].

Tabla 8. Reactivos empleados en la preparación de dos litros de solución stock [64].

Reactivo	Cantidad
KCl	27.9 g
H ₃ BO ₃	25.0 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	12.5 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.7 g
(NH ₄) ₆ Mo ₂ O ₂₄ ·4H ₂ O	5.5 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 g
H ₂ SO ₄	10.8 mL
Agua destilada	1.99 L

6.4. Preparación del inóculo bacteriano

Cada una de las cepas bacterianas se sembró en medio de cultivo TY (Tabla 9), se incubó durante cinco días a $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y a 150 ± 5 rpm en medio líquido. En medio sólido se incubaron a $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por cinco días [65].

Tabla 9. Reactivos empleados para preparar un litro^ϕ de medio de cultivo TY [66].

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.6 g
Agarosa ^μ	18 g

^ϕ Aforar a 1 litro con agua destilada.

^μ Para medio líquido no se aplica agarosa.

6.5. Colecta y análisis de datos

6.5.1. Unidades SPAD

Para la cuantificación de las unidades SPAD se utilizó un medidor portátil Minolta SPAD-502 Plus®, y se midió en las hojas de las plantas de cada UE. La medición se realizó a los 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34 DDS para el caso del cultivo de soya y a los 10, 15, 20, 25, 30 y 35 DDS para el caso de los cultivos de frijol común y chícharo; esto debido a las variaciones de crecimiento de cada uno de los cultivos. Las unidades SPAD se caracterizan por ser una medida indirecta de la clorofila, a través de la absorbancia determinada entre las longitudes de onda de las regiones roja y cercana al infrarrojo.

6.5.2. Caracterización morfológica y nodulación

Se realizaron muestreos destructivos a los 20 y 35 DDS. En el primer muestreo *i.e.* 20 DDS, se seleccionaron aleatoriamente tres UE de cada tratamiento y a los 35 días DDS se muestrearon las tres unidades restantes de cada tratamiento. Durante los muestreos destructivos cada planta se sacó de su respectiva maceta y se le retiró el sustrato (vermiculita) teniendo cuidado de no dañar el sistema radicular. La raíz se separó de la parte aérea y se determinó su longitud, posteriormente se lavó, se dejó escurrir durante cinco minutos y se pesó para determinar su peso fresco. Instantes después, la parte aérea de cada planta se midió y pesó.

Para determinar el número de nódulos activos se realizó un conteo y caracterización de los mismos de acuerdo a su coloración y tamaño. Se consideró que los nódulos de color rosado son nódulos activos *i.e.* fijan N atmosférico, mientras que los nódulos con coloraciones oscuras se contabilizaron como nódulos inactivos [64]. El tamaño de los nódulos fue determinado a través de un análisis de imágenes usando el software Image J®.

Luego de registrar los datos de cada planta, su respectiva raíz, parte aérea y nódulos se colocaron en bolsas de papel debidamente etiquetadas y se dejaron secar a temperatura ambiente, para posteriormente registrar sus pesos secos.

Esta metodología se siguió para cada uno de los cultivos empleados en esta investigación.

6.5.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de unidades SPAD y de las características morfológicas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias aritméticas mediante el método de Tukey ($\alpha = 0.05$), utilizando el software Statistical Analysis System (SAS®) para Windows, versión 9.2.

VII. RESULTADOS

7.1. Unidades SPAD del cultivo de soya (*Glycine max* [L.] Merr.)

La adición de NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 a 3 o 6 g L^{-1} no afectó significativamente las unidades SPAD antes de 32 DDS, comparado con el tratamiento control (Figura 3). Sin embargo, las plantas tratadas con NPs de TiO_2 , a ambas concentraciones, y NPs de ZnO a 6 g L^{-1} disminuyeron significativamente sus unidades SPAD a los 32 DDS en comparación con el tratamiento CTL. A los 34 DDS las unidades SPAD del tratamiento acondicionado con NPs de TiO_2 a 6 g L^{-1} disminuyeron significativamente, comparando los resultados obtenidos con los del tratamiento CTL.

7.2. Unidades SPAD del cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

A los 10 DDS las NPs de Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} incrementaron significativamente las unidades SPAD, comparadas con el resto de los tratamientos (Figura 4). Posteriormente, a los 15 DDS los tratamientos de TiO_2 a 3 g L^{-1} y los de ZnO y Fe_2O_3 a ambas concentraciones, aumentaron significativamente la concentración de clorofila, comparada con el tratamiento CTL. A los 20 DDS, los tratamientos acondicionados con NPs de TiO_2 y Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} , aumentaron significativamente los valores de las lecturas de las unidades SPAD, comparadas con el CTL; sin embargo, a los 25, 30 y 35 DDS ninguna de las nanopartículas evaluadas modificó significativamente las unidades SPAD, comparadas con el tratamiento CTL.

7.3. Unidades SPAD del cultivo de chícharo (*Pisum sativum* L.)

Las NPs de TiO₂, a ambas concentraciones, disminuyeron significativamente las unidades SPAD a los 10 y 25 DDS, comparadas con el tratamiento CTL (Figura 5). A los 15 DDS las NPs de Fe₂O₃ a 3 g L⁻¹, así como las NPs de TiO₂, a ambas concentraciones, disminuyeron significativamente las unidades SPAD a los 10 DDS, comparadas con el tratamiento CTL. Veinte DDS las NPs de ZnO a 6 g L⁻¹, así como las NPs de TiO₂, a ambas concentraciones, disminuyeron significativamente las unidades SPAD, comparadas con el tratamiento CTL. A los 30 DDS todos los tratamientos, con excepción del ZnO a 6g L⁻¹, disminuyeron significativamente la concentración de unidades SPAD en hojas, comparado con el tratamiento CTL. A los 35 DDS todos los tratamientos (*i.e.* TiO₂, ZnO y Fe₂O₃ a ambas concentraciones) disminuyeron significativamente las unidades SPAD, comparados con el tratamiento CTL. Todos los tratamientos disminuyeron significativamente las unidades SPAD a través del tiempo *i.e.* hay una correlación negativa entre los DDS y las unidades SPAD. Las NP de TiO₂, a ambas concentraciones, fueron las únicas que disminuyeron significativamente las unidades SPAD en todas las fechas en que se midió dicha variable.

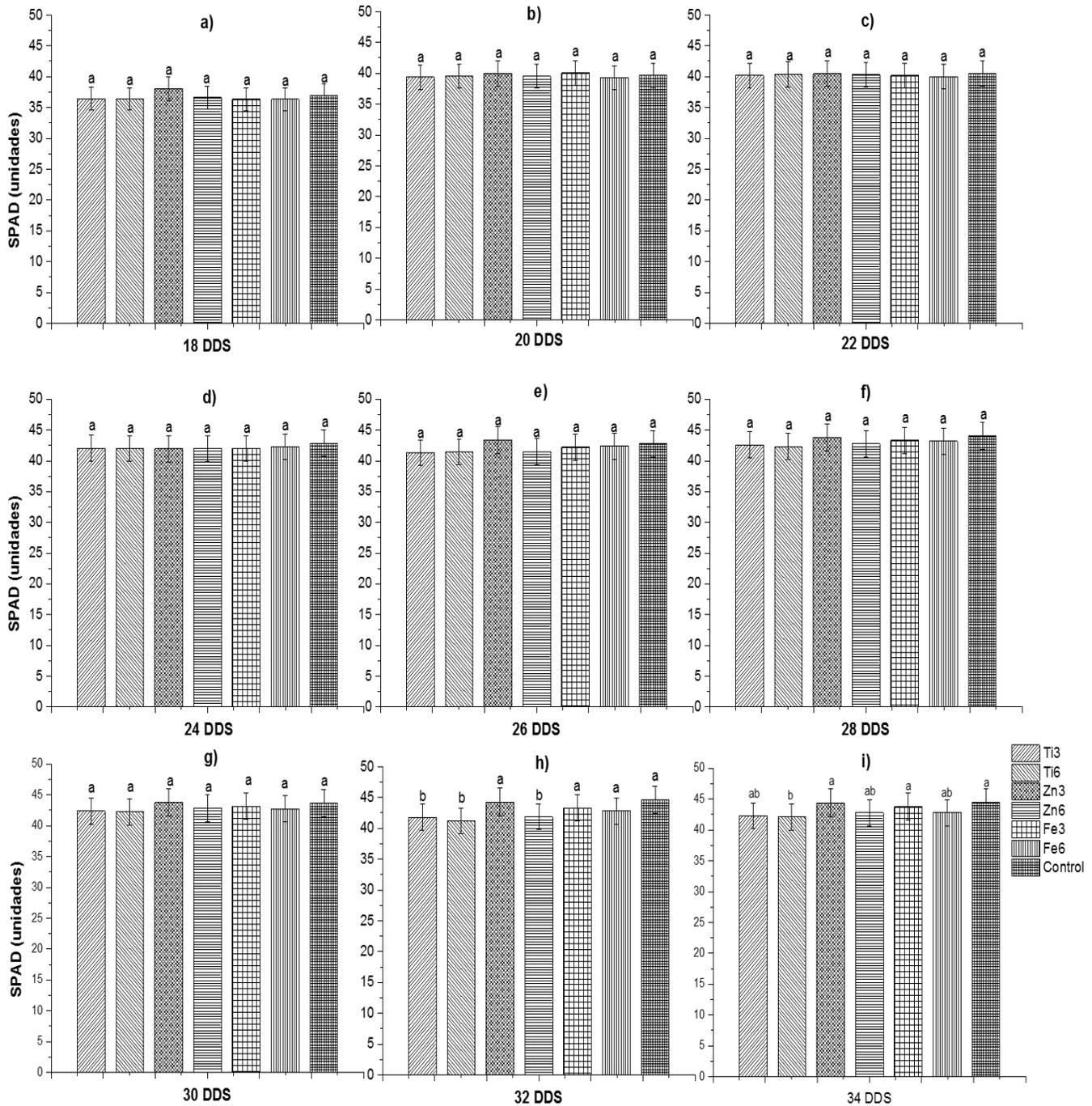


Figura 3. Unidades SPAD en hojas de plantas de soya (*Glycine max* [L.] Merr.), cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones crecientes de nanopartículas de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 . a), b) y c) $n=72$, para d), e), f) g), h) e i) $n=36$. Ti3= TiO_2 a 3 g L^{-1} , Ti6= TiO_2 6 g L^{-1} , Zn3= ZnO a 3 g L^{-1} , Zn6= ZnO a 6 g L^{-1} , Fe3= Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} , Fe6= Fe_2O_3 a 6 g L^{-1} Valores medios con diferente letra indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$).

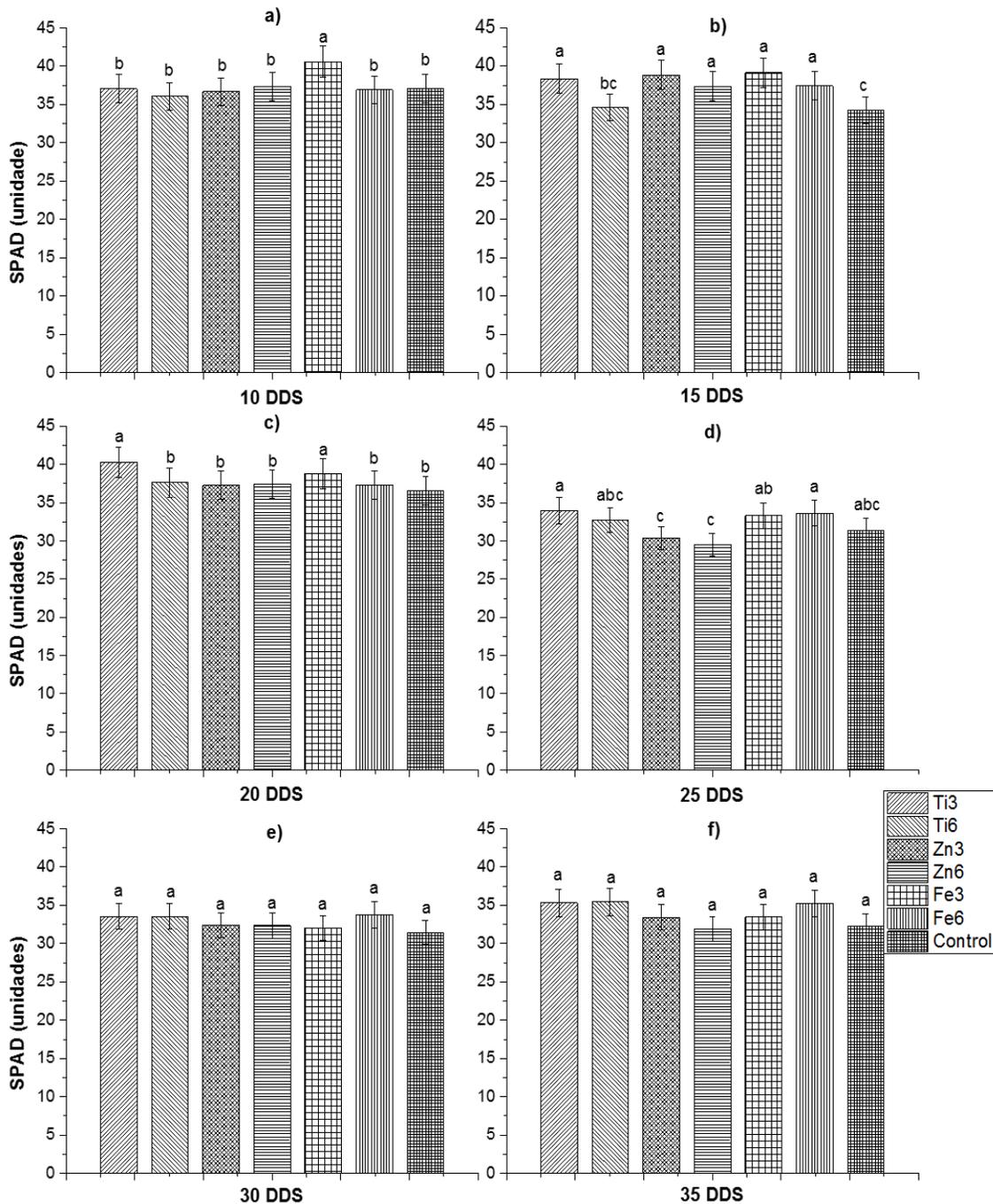


Figura 4. Unidades SPAD en hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones crecientes de nanopartículas de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 . a), b) y c) $n=36$, para d), e) y f) $n=18$. Ti3= TiO_2 a 3 g L^{-1} , Ti6= TiO_2 6 g L^{-1} , Zn3= ZnO a 3 g L^{-1} , Zn6= ZnO a 6 g L^{-1} , Fe3= Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} , Fe6= Fe_2O_3 a 6 g L^{-1} Valores medios con diferente letra indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$).

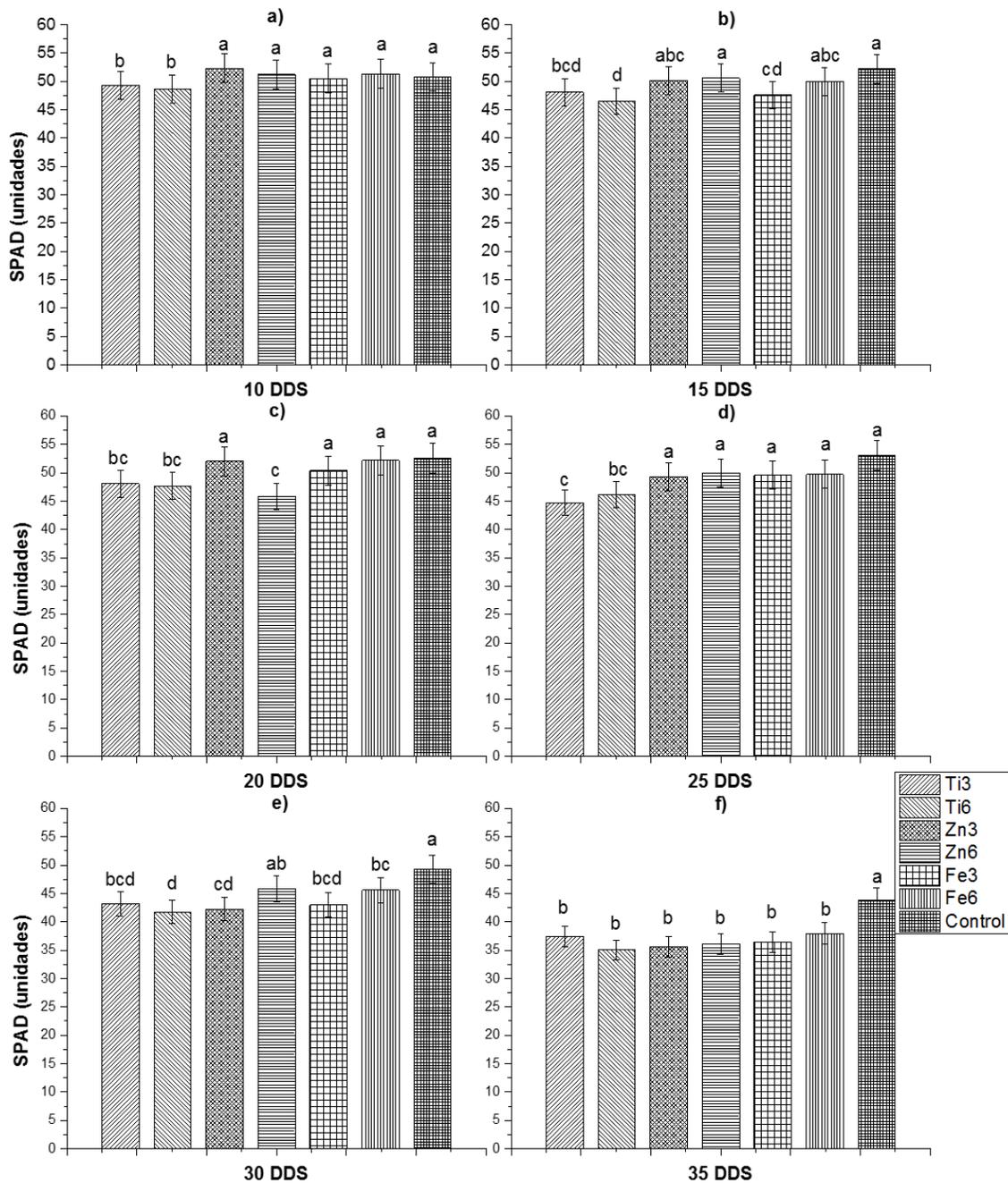


Figura 5. Unidades SPAD en hojas de plantas de chícharo (*Pisum sativum* L.), cultivas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones crecientes de nanopartículas de TiO_2 , ZnO o Fe_2O_3 . a), b) y c) $n=36$, para d), e) y f) $n=18$. Ti3= TiO_2 a 3 g L^{-1} , Ti6= TiO_2 6 g L^{-1} , Zn3= ZnO a 3 g L^{-1} , Zn6= ZnO a 6 g L^{-1} , Fe3= Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} , Fe6= Fe_2O_3 a 6 g L^{-1} Valores medios con diferente letra indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$).

7.4. Características morfológicas del cultivo de soya (*Glycine max* [L.] Merr.)

Ninguna de las nanopartículas evaluadas modificó significativamente la longitud de la parte aérea, el número de nódulos o el diámetro de los nódulos a los 20 DDS, comparados con el tratamiento CTL (Tabla 10). Comportamientos similares se observaron en la longitud y peso fresco de raíz a los 35 DDS. Sin embargo, las NPs de TiO₂, ZnO y Fe₂O₃ disminuyeron significativamente el peso fresco de la parte aérea a los 35 DDS y el peso seco de la parte aérea a los 20 y 35 DDS, comparados con el tratamiento CTL. La suspensión de NPs de ZnO a 3 g L⁻¹ incrementó significativamente la longitud de raíz a los 20 DDS (de 21.4 del CTL a 28.2 cm sería bueno expresarlo en %) pero, disminuyó la longitud de la parte aérea a los 35 DDS, comparado con el tratamiento CTL. Las nanopartículas de TiO₂ y ZnO, a ambas concentraciones, y las de Fe₂O₃ a 6 g L⁻¹ incrementaron significativamente el peso fresco de la raíz a los 20 DDS, comparado con el CTL. Las NPs de ZnO y las de TiO₂ y Fe₂O₃ a 3 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el peso fresco de la parte aérea a los 20 DDS, comparados con el tratamiento CTL. Las NPs de TiO₂ y ZnO, a ambas concentraciones, y las de Fe₂O₃ a 6 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el peso seco de raíz y el número de nódulos de la raíz a los 35 DDS, comparado con el CTL. Las NP de ZnO a 3 g L⁻¹ y las de Fe₂O₃ a 6 g L⁻¹ incrementaron significativamente el peso seco de raíz a los 20 DDS, comparado con el tratamiento CTL. Las NPs de ZnO disminuyeron significativamente el diámetro de nódulos a los 35 DDS, mientras que las NP de TiO₂ a 6 g L⁻¹ y las de Fe₂O₃ a 3 g L⁻¹ lo incrementaron significativamente a los 35 DDS, comparado con el tratamiento CTL. Las NPs evaluadas modificaron significativamente 45 de los 96 valores medios presentados en la Tabla 10, comparados con el tratamiento CTL.

7.5. Características morfológicas del cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Las NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 no modificaron significativamente el peso fresco o seco de la parte aérea a los 20 DDS. El peso fresco de raíz, número y diámetro de nódulos tampoco se vieron afectados por la presencia de estas NPs a los 35 DDS, comparado con el tratamiento CTL (Tabla 14). Las NPs de ZnO a 6 g L^{-1} y las de Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} disminuyeron significativamente la longitud de raíz a los 20 DDS, comparado con el CTL. Las NP de ZnO a 3 g L^{-1} incrementaron significativamente la longitud de raíz a los 35 DDS, comparado con el CTL. La suspensión con NPs de ZnO a 6 g L^{-1} disminuyó significativamente la longitud de la parte aérea a 20 DDS y el peso fresco y seco de la parte aérea a los 35 DDS, comparado con el tratamiento CTL. Las NPs de ZnO y las de Fe_2O_3 a 6 g L^{-1} disminuyeron significativamente la longitud de la parte aérea a los 35 DDS, comparado con el CTL. Las plantas de frijol acondicionadas con altas concentraciones (6 g L^{-1}) de NPs de ZnO y Fe_2O_3 , disminuyeron significativamente el peso fresco de la raíz a los 20 DDS, comparado con el tratamiento CTL. Las NPs de Fe_2O_3 a 3 g L^{-1} y las de TiO_2 a 3 g L^{-1} incrementaron significativamente el peso seco de raíz a los 20 y 35 DDS, comparado con el tratamiento CTL. A los 20 DDS la colonización de las raíces por *R. etli* se incrementó significativamente con la presencia de NPs de Fe_2O_3 , comparada con el CTL.

7.6. Características morfológicas del cultivo de chícharo (*Pisum sativum* L.)

Las NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 no modificaron significativamente el peso fresco de raíz a los 35 DDS, comparadas con el CTL; tampoco modificaron

significativamente el peso fresco o seco de la parte aérea ni el diámetro de nódulos a los 20 DDS, comparado con el tratamiento CTL (Tabla 15). Las NPs de ZnO o Fe₂O₃ a 6 o 3 g L⁻¹, respectivamente, disminuyeron significativamente la longitud de raíz a los 20 DDS, sin embargo, las NPs de ZnO a 3 g L⁻¹ favorecieron significativamente la longitud de la raíz, comparada con el tratamiento CTL. Las NPs de ZnO a 6 g L⁻¹ disminuyeron significativamente la longitud de la parte aérea 20 DDS; efectos similares presentaron las plantas tratadas con NPs de ZnO a ambas concentraciones o con NPs de Fe₂O₃ a 6 g L⁻¹, a los 35 DDS, comparadas con el tratamiento CTL. Las NPs de ZnO u Fe₂O₃ a 6 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el peso fresco de raíz 20 DDS, comparado con el CTL. Las NPs de ZnO a 6 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el peso fresco de la parte aérea a los 35 DDS, las de Fe₂O₃ a 3 g L⁻¹ incrementaron significativamente el peso seco de raíz 20 DDS y las de TiO₂ a 3 g L⁻¹ incrementaron significativamente el peso seco de raíz 35 DDS, comparada con sus respectivos tratamientos CTL. Las NPs de ZnO a 6 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el peso seco de la parte aérea a los 35 DDS. Las NPs de TiO₂, ZnO a ambas concentraciones, así como las de Fe₂O₃ a 3 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el número de nódulos a los 20 DDS, comparado con el CTL. Las NPs de ZnO a ambas concentraciones, así como las de TiO₂ a 6 g L⁻¹ disminuyeron significativamente el número de nódulos a los 35 DDS, sin embargo, las NPs de Fe₂O₃ a 3 g L⁻¹ lo incrementaron significativamente, comparado con el CTL. Las NPs de TiO₂ incrementaron significativamente el diámetro de nódulos a los 35 DDS, comparado con el tratamiento CTL. Las NPs de ZnO modificaron significativamente 6 de las 8 variables evaluadas y las de Fe₂O₃ modificaron significativamente 5 de las 8 variables evaluadas pero, las de TiO₂ solo modificaron significativamente 3 de las 8 variables evaluadas, comparadas con el tratamiento CTL.

Tabla 10. Características de plantas de soya (*Glycine max* [L.] Merr.), cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones a concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃.

Características	DDS ^φ	Tratamientos ^μ							MSD ^Ω
		Ti3	Ti6	Zn3	Zn6	Fe3	Fe6	Control	
Longitud de raíz (cm)	20	25.0 ^{AB†b‡}	26.1 ^{ABa}	28.2 ^{Ab}	25.8 ^{Aba}	25.1 ^{ABb}	24.2 ^{ABb}	21.4 ^{Bb}	10.66
	35	35.9 ^{Aa}	31.3 ^{Aa}	36.5 ^{Aa}	31.3 ^{Aa}	35.3 ^{Aa}	35.8 ^{Aa}	35.4 ^{Aa}	11.99
Longitud de parte aérea (cm)	20	9.1 ^{Ab}	8.7 ^{ABb}	8.1 ^{ABb}	8.3 ^{ABb}	7.6 ^{Bb}	8.9 ^{Ab}	8.2 ^{ABb}	1.92
	35	11.9 ^{Aa}	12.0 ^{Aa}	9.8 ^{Ba}	10.7 ^{ABa}	11.7 ^{Aa}	12.1 ^{Aa}	11.1 ^{Aa}	2.55
Peso fresco de raíz (g)	20	1.9 ^{Ab}	1.9 ^{Ab}	2.2 ^{Ab}	2.3 ^{Ab}	0.6 ^{Bb}	2.0 ^{Ab}	0.8 ^{Bb}	0.80
	35	3.9 ^{Aa}	4.1 ^{Aa}	3.9 ^{Aa}	3.5 ^{Aa}	4.2 ^{Aa}	3.6 ^{Aa}	3.8 ^{Aa}	1.33
Peso fresco parte aérea (g)	20	1.1 ^{Bb}	1.2 ^{ABb}	1.1 ^{Bb}	1.1 ^{Bb}	0.8 ^{Cb}	1.2 ^{ABb}	1.3 ^{Ab}	0.31
	35	2.5 ^{Ca}	3.0 ^{Ba}	2.3 ^{Ca}	2.1 ^{Ca}	2.9 ^{Ba}	2.4 ^{Ca}	3.8 ^{Aa}	0.80
Peso seco de raíz (g)	20	0.12 ^{ABCb}	0.11 ^{BCDb}	0.13 ^{ABb}	0.12 ^{ABCb}	0.09 ^{Db}	0.14 ^{Ab}	0.10 ^{CDb}	0.04
	35	0.26 ^{Ba}	0.29 ^{Ba}	0.28 ^{Ba}	0.26 ^{Ba}	0.34 ^{Aa}	0.30 ^{Ba}	0.37 ^{Aa}	0.08
Peso seco parte aérea (g)	20	0.17 ^{Bb}	0.17 ^{Bb}	0.18 ^{Bb}	0.17 ^{Bb}	0.14 ^{Cb}	0.19 ^{Bb}	0.23 ^{Ab}	0.05
	35	0.49 ^{Ba}	0.48 ^{BCa}	0.39 ^{Da}	0.40 ^{Da}	0.55 ^{Ba}	0.48 ^{BCa}	0.77 ^{Aa}	0.14
Núm. de nódulos (unidades)	20	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0
	35	0.5 ^{Ca}	2.5 ^{BCa}	1.17 ^{Ca}	0.16 ^{Ca}	5.83 ^{ABa}	2.66 ^{BCa}	7.3 ^{Aa}	7.10
Diámetro de nódulos (mm)	20	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0 ^{Ab}	0.0
	35	1.22 ^{BCa}	0.47 ^{CDa}	0.14 ^{Da}	0.50 ^{CDa}	2.59 ^{Aa}	1.56 ^{Ba}	1.59 ^{Ba}	1.52

^φ Días después de la siembra; A los 20 DDS n=6, a los 35 DDS n=6.

^μ Ti3= TiO₂ a 3g L⁻¹, Ti6=TiO₂ 6 g L⁻¹, Zn3= ZnO a 3g L⁻¹, Zn6= ZnO a 6g L⁻¹, Fe3= Fe₂O₃ a 3g L⁻¹, Fe6= Fe₂O₃ a 6g L⁻¹

^Ω Diferencia mínima significativa,

[†] Valores medios con diferente letra mayúscula en cada fila indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, α= 0.05).

[‡] Valores medios con diferente letra minúscula en cada columna, por cada característica de la planta, indican diferencia estadística a través del tiempo (Tukey, α= 0.05).

Tabla 11. Características de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones a concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃.

Características	DDS ^φ	Tratamientos ^μ							MSD ^Ω
		Ti3	Ti6	Zn3	Zn6	Fe3	Fe6	Control	
Longitud de raíz (cm)	20	26.5 ^{A†a‡}	27.4 ^{Aa}	25.5 ^{ABb}	19.5 ^{5Cb}	21.2 ^{BCa}	25.1 ^{ABa}	27.9 ^{Aa}	6.22
	35	22.9 ^{Ba}	28.7 ^{ABa}	34.3 ^{Aa}	27.3 ^{ABa}	24.7 ^{Ba}	28.0 ^{ABa}	25.7 ^{Ba}	10.1
Longitud de parte aérea (cm)	20	19.5 ^{Aba}	18.3 ^{ABa}	13.9 ^{ABa}	12.4 ^{Ba}	21.9 ^{ABa}	16.3 ^{ABa}	22.7 ^{Aa}	10.87
	35	22.3 ^{Aba}	19.2 ^{ABa}	12.9 ^{Ba}	12.6 ^{Ba}	19.0 ^{ABa}	16.4 ^{Ba}	26.5 ^{Aa}	14.2
Peso fresco de raíz (g)	20	3.1 ^{ABb}	3.7 ^{Aa}	3.2 ^{ABb}	2.2 ^{Cb}	3.4 ^{Ab}	2.4 ^{BCb}	3.6 ^{Ab}	1.1
	35	5.9 ^{Aa}	4.6 ^{ABa}	5.0 ^{Aba}	4.3 ^{Ba}	5.0 ^{ABa}	5.2 ^{ABa}	5.7 ^{ABa}	1.9
Peso fresco parte aérea (g)	20	3.5 ^{Ab}	3.8 ^{Ab}	3.6 ^{Ab}	3.3 ^{Ab}	4.6 ^{Aa}	3.5 ^{Ab}	4.4 ^{Ab}	1.8
	35	5.9 ^{Aba}	5.7 ^{ABa}	5.7 ^{Aba}	4.5 ^{Ba}	6.0 ^{ABa}	6.0 ^{ABa}	7.4 ^{Aa}	2.9
Peso seco de raíz (g)	20	0.27 ^{ABCb}	0.28 ^{ABa}	0.28 ^{ABCa}	0.22 ^{Cb}	0.32 ^{Aa}	0.24 ^{BCb}	0.23 ^{BCb}	0.07
	35	0.35 ^{Aa}	0.32 ^{ABa}	0.31 ^{ABa}	0.29 ^{Ba}	0.30 ^{Ba}	0.32 ^{ABa}	0.29 ^{Ba}	0.08
Peso seco parte aérea (g)	20	0.50 ^{Ab}	0.61 ^{Aa}	0.49 ^{Ab}	0.49 ^{Aa}	0.76 ^{Aa}	0.55 ^{Aa}	0.64 ^{Ab}	0.4
	35	1.03 ^{Aa}	0.90 ^{ABa}	0.80 ^{ABa}	0.65 ^{Ba}	0.89 ^{ABa}	0.83 ^{ABa}	1.03 ^{Aa}	0.5
Núm. de nódulos (unidades)	20	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ba}	5.0 ^{Aa}	4.7 ^{Aa}	0.0 ^{Ba}	5.8
	35	1.8 ^{Aa}	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Aa}	22.3 ^{Aa}	8.0 ^{Aa}	9.8 ^{Aa}	33.6
Diámetro de nódulos (mm)	20	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ba}	0.7 ^{Aa}	0.6 ^{Aa}	0.0 ^{Ba}	0.7
	35	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Aa}	0.0 ^{Aa}	0.66 ^{Aa}	0.73 ^{Aa}	0.52 ^{Aa}	1.1

^φ Días después de la siembra; A los 20 DDS n=6, a los 35 DDS n=6.

^μ Ti3= TiO₂ a 3g L⁻¹, Ti6=TiO₂ 6 g L⁻¹, Zn3= ZnO a 3g L⁻¹, Zn6= ZnO a 6g L⁻¹, Fe3= Fe₂O₃ a 3g L⁻¹, Fe6= Fe₂O₃ a 6g L⁻¹

^Ω Diferencia mínima significativa,

[†] Valores medios con diferente letra mayúscula en cada fila indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$),

[‡] Valores medios con diferente letra minúscula en cada columna, por cada característica de la planta, indican diferencia estadística a través del tiempo (Tukey $\alpha=0.05$).

Tabla 12. Características de plantas de chícharo (*Pisum sativum* L.) cultivadas en condiciones de invernadero e irrigadas con solución nutritiva y 500 mL de suspensiones a concentraciones crecientes de nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃.

Características	DDS φ	Tratamientos ^μ							MSD ^Ω
		Ti3	Ti6	Zn3	Zn6	Fe3	Fe6	Control	
Longitud de raíz (cm)	20	26.5 ^{A†aε}	27.4 ^{Aa}	25.5 ^{ABb}	19.5 ^{Cb}	21.1 ^{BCa}	25.1 ^{ABa}	27.9 ^{Aa}	7.8
	35	22.9 ^{Ba}	28.7 ^{ABa}	34.3 ^{Aa}	27.4 ^{ABa}	24.7 ^{Ba}	28.0 ^{ABa}	25.8 ^{Ba}	11.1
Longitud de parte aérea (cm)	20	19.5 ^{Aba}	18.3 ^{ABa}	19.9 ^{ABa}	12.4 ^{Ba}	21.9 ^{ABa}	16.4 ^{ABa}	22.7 ^{Aa}	14.5
	35	22.3 ^{Aba}	19.2 ^{ABa}	12.9 ^{Ba}	12.6 ^{Ba}	19.0 ^{ABa}	16.4 ^{Ba}	26.5 ^{Aa}	14.2
Peso fresco de raíz (g)	20	3.0 ^{ABb}	3.7 ^{Aa}	3.2 ^{ABb}	2.2 ^{Cb}	3.4 ^{Ab}	2.4 ^{BCb}	3.6 ^{Ab}	1.3
	35	6.0 ^{Aa}	4.6 ^{ABa}	5.1 ^{Aba}	4.4 ^{Ba}	5.0 ^{ABa}	5.2 ^{ABa}	5.7 ^{ABa}	1.9
Peso fresco parte aérea (g)	20	3.5 ^{Ab}	3.8 ^{Ab}	3.6 ^{Ab}	3.3 ^{Ab}	4.6 ^{Aa}	3.5 ^{Ab}	4.4 ^{Ab}	2.0
	35	5.9 ^{Aba}	5.7 ^{ABa}	5.7 ^{Aba}	4.6 ^{Ba}	6.0 ^{ABa}	6.0 ^{ABa}	7.4 ^{Aa}	2.8
Peso seco de raíz (g)	20	0.26 ^{ABCb}	0.28 ^{ABa}	0.28 ^{ABCa}	0.22 ^{Cb}	0.32 ^{Aa}	0.24 ^{BCb}	0.23 ^{BCb}	0.07
	35	0.36 ^{Aa}	0.32 ^{ABa}	0.31 ^{ABa}	0.29 ^{Ba}	0.30 ^{Ba}	0.32 ^{ABa}	0.29 ^{Ba}	0.07
Peso seco parte aérea (g)	20	0.50 ^{Ab}	0.61 ^{Aa}	0.49 ^{Ab}	0.48 ^{Aa}	0.76 ^{Aa}	0.56 ^{Aa}	0.64 ^{Ab}	0.4
	35	1.03 ^{Aa}	0.90 ^{ABa}	0.80 ^{ABa}	0.65 ^{Ba}	0.89 ^{ABa}	0.84 ^{ABa}	1.03 ^{Aa}	0.4
Núm. de nódulos (unidades)	20	3.00 ^{Cb}	0.66 ^{Db}	1.16 ^{Db}	0.33 ^{Db}	3.83 ^{BCb}	5.16 ^{ABb}	5.83 ^{Aa}	2.8
	35	7.17 ^{Ba}	3.67 ^{Ca}	2.00 ^{Ca}	2.17 ^{Ca}	10.33 ^{Aa}	9.3 ^{ABa}	6.83 ^{Ba}	4.1
Diámetro de nódulos (mm)	20	1.14 ^{ABb}	0.49 ^{Bb}	1.21 ^{Aa}	0.68 ^{ABa}	1.12 ^{Aba}	1.20 ^{Aa}	0.75 ^{ABb}	0.9
	35	2.00 ^{Aa}	1.37 ^{Ba}	0.97 ^{CDa}	0.88 ^{Da}	0.96 ^{CDa}	1.21 ^{BCa}	1.03 ^{CDa}	0.4

φ Días después de la siembra; A los 20 DDS n=6, a los 35 DDS n=6.

μ Ti3= TiO₂ a 3g L⁻¹, Ti6=TiO₂ 6 g L⁻¹, Zn3= ZnO a 3g L⁻¹, Zn6= ZnO a 6g L⁻¹, Fe3= Fe₂O₃ a 3g L⁻¹, Fe6= Fe₂O₃ a 6g L⁻¹

Ω Diferencia mínima significativa,

† Valores medios con diferente letra mayúscula en cada fila indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey α= 0.05),

ε Valores medios con diferente letra minúscula en cada columna, por cada característica de la planta, indican diferencia estadística a través del tiempo (Tukey α= 0.05).

VIII. DISCUSIONES

La determinación de las unidades SPAD en las hojas de los cultivos permitió realizar mediciones instantáneas del valor SPAD, sin necesidad de realizar muestreos destructivos de las hojas de las plantas. Las unidades SPAD están altamente correlacionadas con el contenido de clorofila de la hoja, lo que hace posible la identificación de deficiencias de nitrógeno y la determinación de algunas alteraciones fisiológicas relacionadas con la fotosíntesis. Varias contribuciones científicas recomiendan el medidor de clorofila SPAD-502 para evaluar el estado nutricional de los cultivos, en especial la deficiencia o toxicidad de nitrógeno inorgánico en cultivos de importancia social y económica como frijol [67], lechuga [68], algodón [69], calabacín [70], entre otros.

Las NPs adicionadas al cultivo de soya a diferentes concentraciones no afectaron de manera significativa las unidades SPAD, obteniéndose valores de 36.34 a 43.76 unidades en los tratamientos estudiados antes de los 32 DDS. Esos valores se asemejan a los obtenidos en el tratamiento control, que van de 36.97 a 46.67 unidades SPAD. Barbosa *et al.* (2009), encontraron que valores mayores a 42 unidades SPAD no presentan deficiencia de nitrógeno, lo cual se traduce a que las plantas poseen buen estado nutricional [67]. En este sentido, podemos inferir que las NPs evaluadas no afectaron los procesos fisiológicos, relacionados con la fotosíntesis de las plantas de soya.

Las unidades SPAD del cultivo de frijol aumentaron a los 10 DDS en los tratamientos acondicionados con NPs de Fe_2O_3 a 3g L^{-1} , alcanzando valores de 40.58, y siendo estadísticamente mayor que el valor de 37.09 correspondiente al control. Con base en lo anterior, los valores encontrados fueron bajos en comparación con los reportados por Barbosa *et al.* [67], quienes afirman que valores menores a 42 unidades se relacionan con un bajo nivel nutricional. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las unidades SPAD pueden variar de acuerdo a diversos parámetros como las condiciones climáticas, la radiación solar, enfermedades de las plantas, posición de la hoja, etc., [67]. Es importante señalar que durante el proceso de fijación biológica de nitrógeno hay absorción de nitrógeno, por lo que se podría esperar un incremento significativo de las unidades SPAD pero, a pesar de eso, McKenzie *et al.* [71], reportaron que el incremento de las unidades SPAD en el cultivo de frijol no está correlacionado con la simbiosis rhizobia-frijol, ya que, como se pudo observar en esta

investigación, la presencia de nódulos en las raíces de frijol no asegura un incremento en los valores de unidades SPAD.

El comportamiento de las unidades SPAD en el cultivo de chícharo, a los 35 DDS, se caracterizó por que estas disminuyeron en todos los tratamientos, en comparación con tratamiento control, por lo que, con respecto a lo reportado por Barbosa *et al.*, los valores obtenidos en esta medición indican un bajo nivel nutricional en las plantas de chícharo durante su desarrollo [67]. Es importante señalar que cada cultivo responde diferencialmente a los factores bióticos y abióticos, por lo que en esta investigación se discuten únicamente las diferencias significativas dentro de cada cultivo, por separado *i.e.* agronómica o ambientalmente no es posible medir y discutir efectos similares en cultivos diferentes porque el desarrollo de cada cultivo es la respuesta de la carga genética de la semilla y de la interacción de la plántula o planta (según su etapa fenológica) con el ambiente.

Fan *et al.*, (2014), reportan que la exposición de plantas de chícharo a NPs de TiO₂ no causó efectos significativos en la morfología de la planta, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio a 20 DDS de semillas de soya [2]. Sin embargo Fernández-Luqueño *et al.* (2014), informaron que algunas características morfológicas de *Petroselinum sativum* Hoffman, *Antirrhinum majus* L., y *Origanum vulgare* L. fueron afectadas por al menos una de las cinco NPs empleadas en su investigación (Fe₃O₄, Fe₂O₃, FeOOH • xH₂O, TiO₂ y ZnO), cuando las especies vegetales se cultivaron en una cámara de crecimiento de plantas [72].

Las NPs de ZnO a 3g L⁻¹ aumentaron la longitud de la raíz en plantas de soya, lo que contrasta con lo reportado por Huang *et al.* [72], quienes indican que la exposición de plantas de chícharo a NPs de ZnO a 1 g L⁻¹, mostró disminución significativa en la longitud de la raíz y cambios significativos en la morfología de las plantas [73]. Así mismo, Burke *et al.* [73] informaron que las nanopartículas de Fe₃O₄ pueden afectar al sistema de raíces así como el contenido de fósforo de la hoja de las plantas de soya [74], sin embargo, Ngo *et al.* [74], encontraron que los NPs de hierro aumentaron hasta 16% el rendimiento de la soya en comparación con su tratamiento control [75]. En este sentido, es necesario determinar la estabilidad de las NPs en el suelo, debido a que un efecto favorable de NPs de hierro sobre los cultivos solo podría explicarse si: i) las NPs se transforman y liberan hierro al suelo, el cual

posteriormente deberá ser absorbido por la planta, ii) si las NPs son absorbidas por las plantas para luego metabolizarlas e incorporarlas a algún proceso fisiológico, o a su estructura (células o tejidos), o bien, iii) generar efectos positivos al activar el metabolismo secundario de las plantas. Lo anterior, en cumplimiento a los criterios de esencialidad de los nutrientes de Arnon [76].

Con respecto a los resultados obtenidos sobre la simbiosis rhizobia-leguminosa (SRL) en el cultivo de soya, en la primera etapa del experimento (20 DDS), no se observaron cambios significativos en el desarrollo y el número de nódulos, sin embargo, a los 35 DDS, se observó que la presencia de NPs redujo significativamente el número de nódulos, lo que coincide con lo reportado por Fan *et al.* [2] y Huang *et al.* [72], en sus investigaciones, donde ambos grupos de investigación reportaron que la exposición de NPs sobre plantas de chícharo inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* tiene un efecto tóxico en la simbiosis de chícharo-*R. leguminosarum*, debido a que las NPs retrasan el proceso de FBN [2] y [73].

Los resultados sobre la morfología de plantas de frijol, nuestros hallazgos coinciden con lo reportado por Dimkpa *et al.* [75], quienes observaron que la presencia de NPs de ZnO a concentraciones de hasta 1 g L⁻¹, disminuyó significativamente la longitud de la raíz y la parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* L., en comparación con el control, lo que evidencia que la presencia de este tipo de NPs en el suelo tienen potencial tóxico al estar en contacto con plantas [77].

Los resultados sobre la SRL en plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium etli* presentaron el mismo comportamiento que en el cultivo de soya, lo que coincide de igual manera a los resultados reportados por Fan *et al.* [2] y Huang *et al.* [73]. En contraste con lo anterior, en esta investigación se observó que las NPs de óxido de hierro a ambas concentraciones favorecieron la SRL, lo que coincide con lo reportado por Burke *et al.* [73], quienes observaron un aumento significativo en la colonización de las raíces de soya por rhizobias, cuando fueron expuestos a NPs de Fe₃O₄, lo que sugiere que algunas NPs de composición ferrosa son capaces de establecer Fe libre y aumentar la colonización de las raíces debido a que el Fe es un micronutriente esencial para las plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno, es decir, las NPs de Fe₃O₄ podrían desencadenar algunas señales bioquímicas que aumentan la colonización y el crecimiento de nódulos [74].

Finalmente, los resultados obtenidos en las plantas de chícharo son consistentes con los reportados por Fan *et al.* [2], quienes encontraron que la presencia de NPs de TiO₂ en concentraciones de hasta 1 g L⁻¹, no mostró efectos significativos en el largo de las raíces de las plantas de chícharo. Además, esos mismos autores también reportaron que la longitud de brotes y la zona media de la superficie de las hojas no se vieron afectados por la presencia de NPs de TiO₂, lo cual también coincide con los resultados obtenidos en esta investigación. En contraste con lo anterior Huang *et al.* [72], reportaron que la exposición de plantas de chícharo a concentraciones de hasta 1 g L⁻¹ de NPs de ZnO, disminuyó la longitud de la raíz y desencadenó algunos cambios significativos en la morfología de plantas de chícharo, es decir, las NPs de ZnO disminuyeron el número de raíces de primer y segundo orden. Además, estos autores informaron que las NPs de ZnO disminuyen significativamente la longitud de brotes y la disminución de la superficie media de las hojas de chícharo [73].

Para el caso de la SRL en plantas de chícharo inoculadas con *Rhizobium leguminosarum*, los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Fan *et al.* [2] y Huang *et al.* [72], y tuvieron el mismo comportamiento que los resultados del cultivo de frijol de esta investigación; de igual manera, se pudo observar un efecto benéfico de las NPs de óxido de hierro sobre las plantas de chícharo, lo que también coincide con lo reportado por Burke *et al.* [74].

Varios grupos de investigación han tratado de entender el efecto de la aplicación de NPs sobre el crecimiento de diversas especies de plantas. Por ejemplo, Martínez-Fernández *et al.* [76], reportaron la reducción de la funcionalidad de la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) por nanopartículas de óxido de hierro [78], así mismo, Lin y Xing [77] reportaron que las nanopartículas de ZnO pueden inhibir la germinación de semillas de raigrás [79], de igual manera Mattiello *et al.* [78] encontraron que NPs de CeO₂ y NPs de TiO₂ a una concentración de 2000 mg L⁻¹, no afectaron significativamente la germinación y elongación de las raíces de plantas de cebada. Sin embargo, informaron que las NPs de CeO₂ tienen efecto genotóxico induciendo la reducción del índice mitótico de las plantas tratadas, lo que demuestra el efecto negativo que las NPs de CeO₂ en el ciclo celular [80].

IX. CONCLUSIONES

Las NPs modifican significativamente algunas características morfológicas como la longitud de raíz y parte aérea de las plantas, haciendo que estas reduzcan su tamaño normal de crecimiento; así como en la simbiosis rizobia-leguminosa, donde se presentó una reducción en la interacción simbiótica principalmente con la presencia de NPs de TiO_2 y ZnO . Los efectos causados por las NPs son dependientes de la concentración de las NPs, del tipo de NPs, del tiempo de exposición (20 Y 35 DDS) y del tipo de cultivo, por lo que se sugiere llevar a cabo estudios adicionales como; análisis por microscopía electrónica de barrido y análisis elemental por EDS (espectroscopía de energía dispersiva), así como espectroscopía ICP, para detectar la absorción de NPs por el sistema de raíces hacia las partes aéreas de las plantas y poder evaluar los efectos potenciales de las NPs en otros cultivos de alto valor económico y social.

Los procesos de adsorción, acumulación y translocación de NPs en los cultivos aún no se han descrito completamente, pero nuestras evidencias sugieren que las NPs interfieren en algunos procesos fisiológicos y morfológicos de los cultivos.

X. PERSPECTIVAS

Entender todos los procesos físicos, químicos y biológicos involucrados en la interacción NP-cultivo permitiría determinar límites máximos en el ambiente, regular la liberación o disposición de NPs y aprovechar las modificaciones significativas deseables, como sería por ejemplo, el incremento en rendimiento o la resistencia a plagas o enfermedades. Lo anterior permitiría introducir de forma segura la nanotecnología al sector agrícola, mejorar la calidad y cantidad de los productos y, garantizar la calidad del medio ambiente para contribuir al desarrollo sustentable.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. N Alam, N. Roy, D. Mandal y N. Begum. Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties. *Rsc. Adv.* 3 (2013) 11935.
- [2] R. Fan, Y. Huang, M. Grusak, C. Huang y D. Sherrier. Effects of nano-TiO₂ on the agronomically-relevant Rhizobium-legume symbiosis. *Sci. Total Environ.* 466 (2014) 503-512.
- [3] A. López-Peralta. Nanotecnología en la ingeniería petrolera: conceptualización, aplicaciones e identificación de modelos de flujo. (Tesis licenciatura), Facultad de ingeniería, UNAM, México, 2013.
- [4] C. E. Gutierrez Wing. Las nanoparticulas: pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto Nuclear.* 39 (2005) 24-29.
- [5] F. Diaz del Castillo Rodríguez. Lecturas de ingeniería 20: introducción a los nanomateriales [En línea]. disponible: http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/Introduccion%20a%20los%20nanomateriales.pdf. [Último acceso: 20 05 2016].
- [6] A. Sánchez Solís. Síntesis y caracterización de puntos cuanticos de CdSe con aplicaciones en celdas fotovoltaicas con configuracion FTO/TiO₂/CdSe/ZnS [En línea]. disponible: <http://biblioteca.cio.mx/tesis/16203.pdf>. [Último acceso: 20 05 2016].
- [7] V. Pombo Barros y V. Goyanes Villaescusa. Quantum dots: the new contribution of nanotechnology yo research and medicine. *RCCV.* 5 (2011) 69-102.

- [8] M. Fernández García y J. Rodríguez, en: C. Lukehart y R. Scott (Eds.), *Nanomaterials: inorganic and diorganic perspectives*, Wiley-Blackwell, Westa Sussex, 2008, pp. 30-87.
- [9] S. Corr, en: P. O'Brien (Eds.), *Nanoscience, vol 1: nanostructures through chemistry*, Royal Soc Chemistry, Cambridge, 2013, pp. 180-207.
- [10] J. Kumari, D. Kumar, A. Mathur, A. Nesser, R. Kumar, P. Thanjavur Chandrasekaran, G. Chaudhuri, M. Pulimi, A. Raichur, S. Babu, N. Chandrasekaran, R. Nagarajan y A. Mukherjee. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles towards freshwater sediment microorganisms at low exposure concentrations. *Environ. Res.* 135 (2014) 333-345.
- [11] I. Sadiq, S. Dalai, N. Chandrasekaran y A. Mukherjee. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 1180-1187.
- [12] J. Ji, Z. Long y D. Lin. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chem. Eng. J.* 170 (2011) 525-530.
- [13] A. Peix, M. Ramírez-Bahena, E. Velázquez y E. Bedmar. Bacterial associations with legumes. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 34 (2014) 17-42.
- [14] M. Fernández, M. Alonso-Blázquez, C. García-Gómez y M. Babin, Evaluation of zinc oxide nanoparticle toxicity in sludge products applied to agricultural soil using multispecies soil systems. *Sci. Total Environ.* 49 (2014) 688-696.
- [15] N. Puay, G. Qiu y Y. Ting. Effect of Zinc oxide nanoparticles on biological wastewater treatment in a sequencing batch reactor. *J. Clean. Prod.* 88 (2015) 139-145.

- [16] Y. Ge, J. Schimel y P. Holden. Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1659-1664.
- [17] C. Weis, F. Blank, A. West, G. Black, R. Woodwars, M. Carroll, A. Mainka, R. Kartmann, A. Brandl, H. Bruns, E. Hallam, J. Shaw, J. Murphy, W. Teoh, K. Aifantis, R. Amal, M. House, T. Pierre y B. Fabry. Labeling of cancer cells with magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.* 71 (2014) 1896-1905.
- [18] S. Sun, C. Wei, Z. Zhu, Y. Hou, S. Venkatraman y Z. Xu. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Phys. B.* 23 (2014) 037503.
- [19] R. Peterson, B. Cunningham y J. Andrade. A photonic crystal biosensor assay for ferritin utilizing iron-oxide nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 320-327.
- [20] K. Thandavan, S. Gandhi, N. Nesakumar, S. Sethuraman, J. Rayappan y U. Krishnan. Hydrogen peroxide biosensor utilizing a hybrid nano-interface of iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes to assess the quality of milk. *Sensors Actuators B Chem.* 215 (2015) 166-173.
- [21] J. Borcherdig, J. Baltrusaitis, H. Chen, L. Stebounova, C. Wu, G. Rubasinghege, I. Mudunkotuwa, J. Caraballo, J. Zabner, V. Grassian y A. Comellas. Iron oxide nanoparticles induce *Pseudomonas aeruginosa* growth, induce biofilm formation, and inhibit antimicrobial peptide function. *Environ. Sci. Nano.* 1 (2014) 123-132.
- [22] L. Otero-González, C. García-Saucedo, J. Field y R. Sierra-Álviz. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, Fe₀, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the

- yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*. 93 (2013) 1201-1206.
- [23] A. Boldrin , S. Hasen, A. Baun, N. Hartmann y T. Astrup. Environmental exposure assessment framework for nanoparticles in solid waste. *J. Nanopart. Res.* 16 (2014) 2394.
- [24] A. Keller, S. McFerran, A. Lazareva y S. Suh. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1692.
- [25] B. Nowack y T. Bucheli. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150 (2007) 5-22.
- [26] A. Parveen y S. Rao. Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*. *J. Clust. Sci.* 26 (2015) 693-701.
- [27] K. Dietz y S. Herth. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 16 (2011) 582-589.
- [28] P. Smýkal, C. Coyne, M. Ambrose, N. Maxted, H. Schaefer, M. Blair, J. Berger, S. Greene, M. Nelson, N. Besharat, T. Vymyslický, C. Toker, R. Saxena, M. Roorkiwal, M. Pandey, J. Hu, Y. Li, L. Wang, Y. Guo, J. Qiu, R. Redden y R. Varshney. *Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding*. CRC. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34 (2015) 43-104.
- [29] M. Olvera-Novoa y L. Olivera-Castillo, en: R. Civera-Cerecedo, C. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie y L. Cruz-Suárez (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola: Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, La Paz, B.C.S., 2000, pp. 327-348.
- [30] X. Wang, L. Wu, P. Zhou, C. Li, L. Bin Zhao, Y. An y Y. Chen. Effect of ZnO Nanoparticles on *Medicago sativa* at the Germination Stage. *Appl.*

Mech. Mater. 665 (2014) 583-586.

- [31] M. Ruffini Castiglione, L. Giorgetti, R. Cremonini, S. Bottega y C. Spano. Impact of TiO₂ nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects. *Protoplasma*. 251 (2014) 1471-1479.
- [32] A. Shaw y Z. Hossain. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*. 251 (2013) 906-915.
- [33] A. Shaw, S. Ghosh, H. Kalaji, K. Bosa, M. Brestic, M. Zivcak y Z. Hossain. Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defense and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ. Exp. Bot.* 102 (2014) 37-47.
- [34] L. Xiang, H. Zhao, Y. Li, X. Huang, X. Wu, T. Zhai, Y. Yuan, Q. Cai y C. Mo. Effects of the size and morphology of zinc oxide nanoparticles on the germination of Chinese cabbage seeds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 10452-10462.
- [35] S. Majumdar, I. Almeida, E. Arigi, H. Choi, N. VerBerkmoes, J. Trujillo-Reyes, J. Flores-Margez, J. White, J. Peralta-Videa y J. Gardea-Torresdey. Environmental Effects of Nanoceria on Seed Production of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): A Proteomic Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 13283-13293.
- [36] P. Nair y I. Chung. changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure. *J. Plant Growth Regul.* 34 (2015) 350-361.
- [37] R. Zhang, H. Zhang, C. Tu, X. Hu, L. Li, Y. Luo y P. Christie.

- Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn(II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 11109-11117.
- [38] M. López-Moreno, G. de la Rosa, J. Hernández-Viezcas, H. Castillo-Michel, C. Botez, J. Peralta-Videa y L. Gardea-Torresdey. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7315-7320.
- [39] F. Yanik y F. Vardar. Toxic effects of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles on root growth and development in *Triticum aestivum*. *Water. Air. Soil Pollut.* 226 (2015) 296.
- [40] X. Ochoa, J. Cantúa, L. Montoya y A. Aguilera, Guía para producir soya en el sur de Sonora. Cd. Obregon, Sonora. INIFAP, 2011.
- [41] I. Onor, G. Onor Junior y M. Kambhampati. Ecophysiological effects of nitrogen on soybean [*Glycine max* (L) Merr.]. *OJSS.* 4 (2014) 357-365.
- [42] N. Maldonado Moreno y G. Ascencio Luciano. Huasteca 100, soybean cultivar for the south of Tamaulipas state and the Mexican tropic. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1 (2010) 699-705.
- [43] Programa estrategico de necesidades de investigacion y transparencia de tecnologia del estado de Chiapas [En línea]. Disponible: <http://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit54.pdf>. [Último acceso: 15 julio 2016].
- [44] A. de Luna Jiménez y A. Ponce Montoya. Evaluacion de la precocidad y uniformidad en madurez de diferentes genotipos de soya (*Glycine max* L.

- Merr). *Invtigación y Ciencia*. 8 (1993) 4-11.
- [45] P. Chen, Y. Tang, M. Marcone, P. Pauls, B. Zhang, R. Liu y R. Tsao. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular-and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*. 185 (2015) 298-308.
- [46] E. Osdaghi y M. Lak. A source of resistance to bacterial wilt in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Iran. *Crop Prot*. 74 (2015) 37-41.
- [47] D. Luna-Vital, L. Mojica, E. González de Mejía, S. Mendoza y G. Loarca-Piña. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Res. Int*. 76 (2015) 39-50.
- [48] Secretaría de Economía, Análisis de la cadena de valor del frijol [En línea]. Disponible: http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/analisis_cadena_valor_frijol.pdf. [Último acceso: 15 julio 2016]
- [49] M. Lara Flores. El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria*. 16 (2015) 1-11.
- [50] F. Fernández, P. Gepts y M. López, Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), CIAT, Cali, Colombia: CIAT, 1986.
- [51] P. González La Fe, A. Prats Pérez, J. Gil Vidal, N. Fraga Aguilar y W. Pérez Meirales. Estudio de variedades de guisante (*Pisum sativum* L.) para consumo seco. *Revista Agrotecnia de Cuba*. 29 (2005) 117-123.
- [52] N. Ordoñez. La versatilidad del chicharo *Pisum sativum*. *Tecno. Agro*. 52

(2010) 14.

- [53] Estado de México, Primer Lugar en la Producción de Chícharo [En línea]. Disponible: http://www.poderedomex.com/notas.asp?nota_id=45380 [último acceso: 20 julio 2016].
- [54] W. Yzarra Tito y F. López Ríos, Manual de observaciones fenológicas, Senamhi, Peru, 2011.
- [55] C. Ribeiro, G. Alloing, K. Mandon y P. Frendo. Redox regulation of differentiation in symbiotic nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850 (2015) 1469-1478.
- [56] W. Yang, Z. Kong, W. Chen y G. Wei. Genetic diversity and symbiotic evolution of rhizobia from root nodules of *Coronilla varia*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36 (2013) 49-55.
- [57] J. Anglade, G. Billen y J. Garnier. Relationships for estimating N₂ fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere.* 6 (2015) 1-24.
- [58] B. Gourion, F. Berrabah, P. Ratet y G. Stacey. Rhizobium–legume symbiosis: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20 (2014) 186-194.
- [59] P. Parvatha Reddy, Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection, Springer, New Delhi, 2014, p. 313.
- [60] M. Neveed, I. Mehboob, M. Baqir Hussain y Z. Ahmad Zahir, en: N. Kumar Arora (Ed.), *Plant microbes symbiosis: applied facets*, Springer,

New Delhi, 2014, pp. 209-239.

- [61] D. Biate, A. Kumari, K. Annapurna, L. Vithal Kumar, D. Ramadoss, K. Reddy y S. Naik, en: N. Kumar Arora (Ed.), *Plant microbes symbiosis: applied facets*, Springer, New Delhi, 2014, pp. 259-271.
- [62] A. Rajwar, M. Sahgal y B. Johri, en: N. Arora (Ed.), *Plants microbe symbiosis: fundamentals and advances*, Springer, India, 2013, pp. 233-265.
- [63] X. Perret, C. Staehelin y W. Broughton. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 180-201.
- [64] F. Fernández-Luqueño, L. Dendooven, A. Munive, L. Corlay-Chee, L. Serrano-Covarruvias y D. Espinosa-Victoria. Micro-morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules undergoing senescence. *Acta Physiol. Plant.* 30 (2008) 545-552.
- [65] S. Supanjani, K. Lee, J. Almaraz, X. Zhou y D. Smith. Effect of organic N source on bacterial growth, lipo-chitoooligosaccharide production, and early soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* 52 (2011) 227-236.
- [66] H. Prescott. *Laboratory exercises in microbiology*, WCB/ McGraw-Hill, New York, 2002.
- [67] M. P. Barbosa Filho, T. Cobucci, N. Kumar Fageria y P. Neves Mendes. Timing of nitrogen application on irrigated common bean measured by portable sensor. *Cienc Agrotec.* 33 (2009) 425-431.
- [68] A. Leon, S. Vina , D. Frezza, A. Chaves y A. Chiesa. Estimation of chlorophyll contents by correlations between SPAD-502 meter and

chroma meter in butterhead lettuce. *Commun Soil Sci Plant.* 38 (2007) 2877-2885.

- [69] A. Motomiya, J. Molin y E. Chiavegato. Use of an active optical sensor to detect leaf nitrogen deficiency in cotton. *R. Bras. Eng. Agric. Ambiental.* 13 (2009) 137-145.
- [70] M. Porto, M. Puiatti, P. Fontes, P. Cecon, J. do C Alves y J. de Arruda. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio na cultura da abobrinha. *Hortic. Bras.* 29 (2011) 311-315.
- [71] R. McKenzie, A. Middleton, E. Solberg, j. DeMulder, N. Flore, G. Clayton y E. Bremer. Response of pea to rhizobia inoculation and started nitogen in Alberta. *Can. J. Plant Sci.* 81 (2011) 637-643.
- [72] F. Fernández-Luqueño, F. López-Valdez, M. Valerio-Rodriguez, N. Pariona, J. Hernandez-López, I. García-Ortiz, J. López-Baltazar, M. Vega-Sánchez, R. Espinoza-Zapata y J. Acosta-Gallegos, en: F. López-Valdez y F. Fernández-Luqueño, (Eds.), *Fertilizers: components, uses in agriculture and environmental impacts*, NOVA Science, New York, USA, 2014, pp. 211-224.
- [73] Y. Huang, R. Fan, M. Grusak, D. Sherrier y C. Huang. Effects of nano-ZnO on the agronomically relevant Rhizobium-legume symbiosis. *Sci. Total Environ.* 497 (2014) 78-90.
- [74] D. Burke, N. Pietrasiak, S. Situ, E. Abenojar, M. Porche, P. Kraj, Y. Lakliang y A. Samia. Iron oxide and titanium dioxide nanoparticle effects on plant performance and root associated microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 23630-23650.

- [75] Q. Ngo, T. Dao, H. Nguyen, X. Tran, T. Van Nguyen , T. Khuu y T. Huynh. Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51). *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2014) 015016.
- [76] L. Trejo-Tellez, M. Rodriguez-Mendoza y F. Fernandez-Luqueño, *Nutrición de cultivos, manual, Papiro Omega, México, 2008.*
- [77] C. Dimkpa, T. Hansen, J. Stewart, J. McLean, D. Britt y A. Anderson. ZnO nanoparticles and root colonization by a beneficial pseudomonas influence essential metal responses in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Nanotoxicology.* 9 (2015) 271-278.
- [78] D. Martinez-Fernández, D. Barroso y M. Komarek. Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticles exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 1732-1741.
- [79] D. Lin y B. Xing. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* 150 (2007) 243-250.
- [80] A. Mattiello, A. Filippi, F. Poscic, R. Musetti, M. Salvatici, C. Giordano, M. Vischi, A. Bertolini y L. Marchiol. Evidence of phytotoxicity and genotoxicity in *Hordeum vulgare* L. exposed to CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 1043.