



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD -
FISIOLOGÍA VEGETAL**

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y
MOLECULARES DEL ARROZ A LA APLICACIÓN
DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA**

ROBERT VILCHIS ZIMUTA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

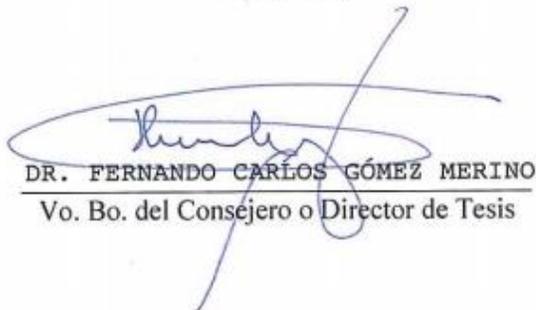
**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe ROBERT VILCHIS ZIMUTA, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares del arroz a la aplicación de nanopartículas de plata y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 26 de noviembre de 2018



Firma del
Alumno (a)



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: “Respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares del arroz a la aplicación de nanopartículas de plata” realizada por el alumno Robert Vilchis Zimuta, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
FISILOGÍA VEGETAL**

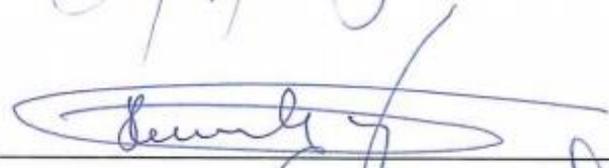
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



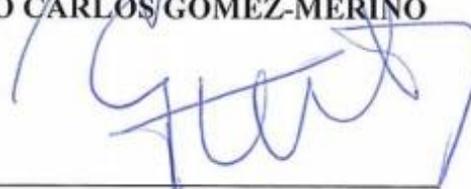
DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ

DIRECTOR DE TESIS:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ-MERINO

ASESOR:



DR. ERNESTO GABRIEL ALCÁNTAR GONZÁLEZ

ASESOR:



DR. JERICÓ JABÍN BELLO-BELLO

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Diciembre de 2018

ANÁLISIS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DEL ARROZ A LA APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Robert Vilchis Zimuta, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Las nanopartículas de plata (AgNPs) están abriendo nuevos horizontes en la producción y sanidad vegetal dado que en algunos cultivos pueden inducir germinación, estimular crecimiento vegetativo, y mostrar efectos antisépticos. El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los tres cereales más consumidos en el mundo, y en México se importa el 80% de la necesidad de consumo, por lo que es necesario probar nuevas estrategias tendientes a mejorar su producción, como lo es el uso de las AgNPs. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de AgNPs en germinación y crecimiento inicial (0, 40, 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs) en cámaras de crecimiento en laboratorio y desarrollo vegetativo (0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs) en hidroponía en invernadero de arroz cv. Morelos A-98 en variables fisiológicas, bioquímicas y moleculares. La exposición de las semillas a 40, 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs indujeron la germinación, en tanto que 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs promovieron el crecimiento inicial. Los tratamientos de AgNPs no afectaron concentración intracelular de oxígeno (Ci) ni tasa transpiratoria (E), pero conductancia estomática (Gs) y tasa fotosintética (A) incrementaron con aplicaciones de 20 mg L⁻¹ AgNPs. Las concentraciones de S y Fe en vástagos incrementaron con la aplicación de AgNPs, mientras que en hojas la aplicación de AgNPs aumentó las concentraciones de N, P, Fe, y Cu. Las AgNPs redujeron las concentraciones de clorofilas en hojas, aumentaron las concentraciones de aminoácidos en raíces y disminuyeron las concentraciones de azúcares totales en vástagos. Las concentraciones de prolina en vástagos aumentaron drásticamente con la aplicación de AgNPs, pero se conservaron estables en raíces. Las AgNPs indujeron la expresión de cuatro genes *NAC* (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g43530* y *Os06g5107*) en al menos una dosis de AgNPs probada, y un gen (*Os08g10080*) mostró represión de la expresión. Se concluye que las AgNPs pueden estimular algunas variables fisiológicas, bioquímicas y moleculares en arroz que pueden mejorar el desempeño del cultivo.

Palabras clave: *Oryza sativa*, AgNPs, germinación, bioquímica, expresión génica, qRT-PCR, genes *NAC*.

PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF RICE TO THE APPLICATION OF SILVER NANOPARTICLES

Robert Vilchis Zimuta, M. Sc.

Collegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) are opening new horizons in plant production and health since in some crops they can induce germination, stimulate vegetative growth, and show antiseptic effects. Rice (*Oryza sativa*) is one of the three most consumed cereals in the world, and in Mexico 80% of the need for consumption is imported, which is why it is necessary to try new strategies to improve its production, such as the use of AgNPs. The aim of the present work was to evaluate the effect of different concentrations of AgNPs on germination and initial growth (0, 40, 80 and 120 mg L⁻¹ AgNPs) in growth chambers in laboratory and vegetative development (0, 20, 40 and 80 mg L⁻¹ AgNPs) in hydroponics in greenhouse of rice cv. Morelos A-98 on physiological, biochemical and molecular variables. Exposure of seeds to 40, 80 and 120 mg L⁻¹ AgNPs induced germination, while 80 and 120 mg L⁻¹ AgNPs promoted initial growth. AgNPs treatments did not affect intracellular oxygen concentration (Ci) or transpiration rate (E), but stomatal conductance (Gs) and photosynthetic rate (A) increased with applications of 20 mg L⁻¹ AgNPs. The concentrations of S and Fe in shoots increased with the application of AgNPs, while in leaves the application of AgNPs increased the concentrations of N, P, Fe, and Cu. The AgNPs reduced leaf chlorophyll concentrations, increased amino acid concentrations in roots, and decreased total sugars in scions. Proline concentrations in shoots increased drastically with the application of AgNPs, but they remained stable in roots. The AgNPs induced the expression of four *NAC* genes (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g43530* and *Os06g5107*) in at least one dose of AgNPs tested, and one gene (*Os08g10080*) showed repression of the expression. It is concluded that AgNPs can stimulate some physiological, biochemical and molecular response variables in rice that can improve crop performance.

Keywords: *Oryza sativa*, AgNPs, germination, biochemistry, gene expression, qRT-PCR, *NAC* genes.

DEDICATORIA

A mi padre **Dios**, mi más grande agradecimiento por darme la oportunidad, sabiduría y fuerza para culminar mis estudios.

A mi madre **Maria E.**, por su amor y cariño incondicional.

A mi padre **Artemio V.**, por sus enseñanzas y consejos.

A mis **hermanos**, por su apoyo y el compartir momentos especiales.

A **Sara M.**, a **Don Robert**, a **la Dra. Lupita**, a **Gloria** y **Don Wences** por su apoyo e impulso.

A mis **amigos y compañeros**, por compartir momentos agradables de sabiduría y aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el financiamiento y apoyos otorgados para llevar a cabo esta investigación y estudio.

Al **Colegio de Postgraduados**, por la oportunidad presentada para el desarrollo de nuevos conocimientos y habilidades profesionales.

Al **Doctor Fernando Carlos Gómez-Merino**, por todo su apoyo, su experiencia, su confianza y aportaciones dedicadas a la presente investigación.

A la **Doctora Libia Iris Trejo-Téllez**, mi profundo agradecimiento por su disposición, su apoyo y enseñanzas en todo el proceso de esta investigación.

Al **Doctor Ernesto G. Alcántar-González**, por sus valiosas observaciones durante la realización de la investigación.

Al **Doctor Jericó Jabín Bello Bello**, por sus valiosas aportaciones y su experiencia para fortalecer este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de la plata	2
Aplicaciones de la plata	3
Nanopartículas de plata en la agricultura	3
Referencias citadas	7
CAPÍTULO I. NANOPARTÍCULAS DE PLATA, EN LA GERMINACIÓN, 10	
CRECIMIENTO INICIAL Y VEGETATIVO EN PLÁNTULAS..... 10	
DE ARROZ (<i>Oriza Sativa</i> L.) CV. MORELOS A-98 10	
1.1. Resumen	10
1.2. Introducción	12
1.3. Materiales y métodos..... 13	
1.3.1. Material vegetal..... 13	
1.3.2. AgNps-PVP de Agrovit..... 13	
1.3.3. Aplicación de AgNPs en germinación de semillas 14	
1.3.4. Aplicación de AgNPs en el desarrollo vegetativo de plantas 15	
1.3.5. Variables evaluadas..... 16	
1.3.6. Análisis estadístico..... 18	
1.4. Resultados..... 18	
1.4.1. Las AgNPs estimulan la germinación en arroz..... 18	
1.4.2. Concentraciones medias de AgNPs estimula la producción de biomasa de vástago y raíz en etapas iniciales de crecimiento de plántulas de arroz..... 19	
1.4.3. Las AgNPs afectan negativamente el crecimiento de plantas de arroz en fase vegetativa 23	
1.4.4. A bajas concentraciones, las AgNPs estimulan algunos indicadores fotosintéticos en arroz 27	

1.4.5. Las AgNPs estimulan la concentración de algunos nutrimentos en tejido vegetal	28
1.4.6. Las AgNPs disminuyen las acumulaciones de macronutrimentos y mantienen estables las de micronutrimentos	37
1.4.7. Las AgNPs disminuyen las concentraciones de clorofilas	43
1.4.8. El AgNPs afectan diferencialmente las concentraciones de aminoácidos y azúcares totales en vástago y raíz.....	45
1.4.9. Las AgNPs aumentan las concentraciones de prolina en vástago, pero no en raíz	46
1.5. Discusión	47
1.5.1. Germinación en arroz.....	47
1.5.2. Producción de biomasa en etapas iniciales de crecimiento de plántulas de arroz.....	48
1.5.3. Crecimiento de plantas de arroz en fase vegetativa	48
1.5.4. Indicadores fotosintéticos en arroz.....	49
1.5.5. Concentraciones y acumulaciones de nutrimentos en vástago.....	50
1.5.6. Concentración de clorofilas.....	51
1.5.7. Concentración de aminoácidos y azúcares solubles.....	51
1.5.8. Concentración de prolina	52
1.6. Conclusiones	52
1.7. Referencias citadas	53
CAPÍTULO II. LA EXPOSICIÓN DE PLANTAS DE ARROZ A NANOPARTÍCULAS DE PLATA AFECTA LA EXPRESIÓN DE GENES MULTIFUNCIONALES NAC	58
2.1. Resumen	58
2.2. Introducción	59
2.3. Materiales y Métodos.....	60
2.3.1. Material vegetal.....	60
2.3.2. Desinfección y siembra de semillas	60
2.3.3. Establecimiento de las plántulas en hidroponía y aplicación de tratamientos	61
2.3.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	61

2.3.5. Selección de genes <i>NAC</i> , genes de referencia e iniciadores usados	62
2.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico de los datos	64
2.4. Resultados y Discusión	64
2.4.1. Calidad y cantidad del RNA total extraído.....	64
2.4.2. Selección de genes de referencia	66
2.4.3. Cuantificación de la expresión génica de factores de transcripción <i>NAC</i>	67
2.5. Conclusiones	70
2.6. Referencias citadas	71
CONCLUSIONES GENERALES.....	74

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 2.1. Lista de iniciadores específicos usados para el análisis qRT-PCR de factores de transcripción <i>NAC</i> de arroz en respuesta a tratamientos de AgNPs.	63
Cuadro 2.2. Indicadores de cantidad y calidad del RNA total extraído de vástago plantas de arroz expuesto a diferentes concentraciones de AgNPs en condiciones hidropónicas en invernadero.	64
Cuadro 2.3. Valores de estabilidad de la expresión (<i>M</i>) de los genes de referencia probados para el análisis de qRT-PCR en vástagos de arroz en respuesta a AgNPs, con base en Vandesompele <i>et al.</i> (2002).	67

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1.1. Cinética de germinación de semillas de arroz cv. Morelos A-98, tratadas con diferentes métodos de desinfestación.	19
Figura 1.2. Crecimiento relativo inicial de plántulas de arroz cv. Morelos A-98 en respuesta a tratamientos de desinfección de semillas con nanopartículas de plata, Benomilo (1%) e hipoclorito de sodio (5%) en condiciones de laboratorio.	20
Figura 1.3. Crecimiento inicial de arroz Morelos A-98 tratadas con AgNPs a concentración de 40, 80 y 120 mg L ⁻¹ , hipoclorito de sodio (5%) y Benomilo (1%).	21
Figura 1.4. Peso de biomasa fresca (a) y seca (b) de vástago y raíz de plántulas de arroz cv. Morelos A-98 provenientes de semillas desinfestadas con nanopartículas de plata, hipoclorito de sodio (5%) y Benomilo (1%).	22
Figura 1.5. Indicadores de crecimiento vegetativo de plantas de arroz expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs a partir de PVP-AgNPs. Altura de planta (a), longitud de raíz (b), número de macollos (c) y volumen de raíz (d). Plantas de 46 d de edad fueron crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L ⁻¹ AgNPs durante 32 días.	24
Figura 1.6. Producción de biomasa de plantas de arroz en respuesta a la aplicación de diferentes concentraciones de AgNPs a partir de PVP-AgNPs. Peso de biomasa fresca de vástagos y raíces (a) Peso de biomasa fresca total de plantas (b), peso de biomasa seca de vástagos y raíces (c) y peso de biomasa seca total de plantas (d).	26
Figura 1.7. Morfología de plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas durante 32 d a concentraciones de 0, 20, 40 y 80 mg L ⁻¹ de nanopartículas de plata (AgNPs) en la solución nutritiva Yoshida al finalizar el experimento, después de 32 días de exposición a AgNPs.	27

- Figura 1.8.** Parámetros de intercambio gaseoso en plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas durante 32 días con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) en la solución nutritiva. a) C_i =Concentración intercelular de CO_2 . b) E =Tasa transpiratoria. c) G_s = Conductancia estomática. d) A = Tasa fotosintética. 28
- Figura 1.9.** Concentración de macronutrientes en vástagos de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs a partir de PVP-AgNPs en solución. 30
- Figura 1.10.** Concentración de micronutrientes y Ag en vástagos de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. 32
- Figura 1.11.** Concentración de macronutrientes en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. 34
- Figura 1.12.** Concentración de micronutrientes y Ag en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs). 36
- Figura 1.13.** Acumulación de macronutrientes en vástago de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. 38
- Figura 1.14.** Acumulación de micronutrientes y Ag en vástago de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. 39
- Figura 1.15.** Acumulación de macronutrientes en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución 41
- Figura 1.16.** Acumulación de micronutrientes y Ag en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. 42

Figura 1.17. Concentración de clorofilas en vástago de arroz por efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de AgNPs a partir de PVP-AgNPs. Concentración de clorofila *a* (a), concentración de clorofila *b* (b) y concentración de clorofila total (c), en vástagos de plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas con AgNPs. 44

Figura 1.18. Concentración de aminoácidos libres totales (a), azúcares totales (b) en vástago y raíz de plantas de arroz cv. Morelos A-98. crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 32 días 46

Figura 1.19. Concentración de prolina en vástago de arroz crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 32 días. 47

Figura 2.1. Electroforesis en gel al 1% de agarosa que ilustra la corrida de las muestras de RNA total extraídas de vástagos de plantas de arroz expuestas a 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs en condiciones hidropónicas en invernadero. 66

Figura 2.2. Niveles de expresión relativa de genes *NAC* en vástagos de plantas de arroz expuestas a diferentes niveles de nanopartículas de plata (AgNPs) en solución nutritiva en condiciones de hidroponía en invernadero. 68

INTRODUCCIÓN

Actualmente los cereales son la fuente primaria de alimentos más importante en calorías y otros nutrientes para la mayoría de la población mundial. Los países en desarrollo dependen del 60% de las calorías provenientes de los granos de cereales, mientras que en los países más pobres esta dependencia es de hasta 80%, y también proporcionan la mayoría de los nutrientes para el ganado (Awika, 2011).

El arroz representa uno de los tres cereales más importante como fuente de calorías en el mundo. Actualmente se cultiva en más de 163 millones de ha en más de 100 países y proporciona el 20% de las calorías consumidas en Asia, África y América Latina (Laborte *et al.*, 2017). Se cultiva en distintos sistemas y ambientes, como monocultivo en regiones templadas y tropicales, en condiciones de secano y de regadío, y en monocultivos intensivos en zonas de regadío en los trópicos, donde el arroz se cultiva hasta dos o tres veces al año (Laborte *et al.*, 2017). Las cifras de producción global de arroz pronosticadas para 2017 fueron de 759.6 millones de toneladas de grano con cáscara, que se traduce en 503.9 millones de toneladas de grano manufacturado; esto representa un aumento del 0.6% en el volumen de producción, respecto al obtenido en el año 2016 (FAO, 2017). Sin embargo, se requiere que la producción crezca en un 42% para el año 2050 a fin de abastecer la demanda proyectada (Ray *et al.*, 2013). En Asia se produce el 90 % del arroz del mundo, y tan solo China e India producen y consumen la mitad de ésta. Además, después del maíz y el trigo, el arroz mantiene una gran importancia económica y estratégicamente para la seguridad alimentaria en América Latina y en México (Muthayya *et al.*, 2014). México importa el 80% del consumo nacional de arroz, y los estados productores son Campeche, Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Tabasco, Tamaulipas con una producción total de 84,941 t, en un total de 13,847 ha (SIAP, 2016). El contexto anterior hace evidente la importancia de la búsqueda de opciones encaminadas a optimizar los recursos en la producción que faciliten la obtención de mayores rendimientos en arroz con plantas de mejor porte y mayor aprovechamiento de los nutrientes minerales aportados (Jiao *et al.*, 2016).

Una alternativa para el incremento de los rendimientos y enfrentar los retos que el cambio climático global impone, es la utilización de elementos benéficos, entre ellos la plata (Ag), que puede ocasionar respuestas horméticas en plantas al ser empleada en dosis, fuentes y modos de aplicación correctos en arroz (García-Jiménez *et al.*, 2018).

Generalidades de la plata

La plata (Ag) es un elemento que se conoce desde la antigüedad, y los depósitos arqueológicos de Asia Menor e islas del Mar Egeo indican que el hombre aprendió a separarla del plomo hacia el año 3000 a. C. (Medina *et al.* 2015).

La plata ocupa el lugar 66 por su abundancia en la corteza terrestre entre los elementos químicos, lo que la ubica dentro de los muy escasos en la naturaleza con concentraciones en la corteza terrestre de 0.06 y 0.13 mg kg⁻¹ (Singh *et al.*, 2016). Se puede encontrar en estado natural, aunque generalmente se encuentra en minerales que contienen compuestos de plata, como con azufre (argentita, Ag₂S), arsénico (proustita, Ag₃AsS₃), antimonio (pirargirita, Ag₃SbS₃) o cloro (plata córnea, AgCl), siendo sulfuros y sulfosales su forma principal. Se estima que tres cuartas partes de su producción se obtienen como un subproducto, sobre todo del cobre y plomo (Medina *et al.* 2015). En su estado puro es un metal brillante, resistente, dúctil y maleable con una dureza moderadamente suave 2.5 a 3 Mohs, presenta un brillo blanco-grisáceo metálico susceptible al pulimiento, y de todos los metales tiene el color blanco óptico reflectivamente más alto, reflejando el 95% de la luz que incide sobre ella y la conductividad térmica y eléctrica más alta (Medina *et al.* 2015).

En la tabla periódica la plata ocupa el número 47, se clasifica como metal de transición y sus estados de oxidación son +1, +2, +3 y +4; tiene estructura cristalina cúbica centrada en las caras, donde cada átomo de Ag tiene un radio iónico 0.126 nm, radio atómico 0.144 nm; su configuración electrónica es [Kr]4d¹⁰5s¹, su primer potencial de ionización es de 758 kJ mol⁻¹ y su segundo potencial de ionización de 2061; una masa atómica 107.87 g mol⁻¹ y una densidad de 10.53 g cm⁻³ a 20 °C (Cotton, 2017),

En un sistema plata-amoniaco-agua (Ag-NH₃-H₂O), cuando el potencial redox del medio aumenta y el pH disminuye se tiene la presencia de plata monovalente; mientras que, en un sistema Ag-S₂O₃-NH₃-H₂O, los compuestos de Ag aumentan el potencial anódico y predominan especies sólidas y solubles conjuntamente; por ejemplo: plata-tiosulfato, plata-sulfito y plata-amoniaco. Estas especies de Ag corresponden al estado de oxidación de la planta que es posible en estas condiciones y las moléculas corresponden a las posibles formadas en presencia de los otros compuestos presentes en el sistema (Bernal, 1996; Aylmore, 2001; Urzúa, 2012).

Aplicaciones de la plata

La plata tiene aplicaciones diversas, como en la fotografía (AgBr), en la medicina [Ag(NO₃)] y odontología; en acuñación de monedas, en electrónica y joyería; aleaciones importantes con cobre (la más frecuente, que endurece la plata hasta en 5%); aleaciones con cadmio que confiere a la aleación resultante ductilidad y maleabilidad adecuadas para el trabajo del metal. Entre los componentes de importancia industrial están: el fulminato de plata (explosivos), yoduro de plata (para crear lluvia artificial), óxido de plata (ánodo en pilas de botón) o nitrato de plata (en emulsiones fotográficas) (Renner *et al.*, 2001).

Una nueva alternativa en el empleo de este metal lo representa la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). La síntesis de AgNPs se puede realizar mediante métodos químicos, físicos o biológicos, siendo estos últimos los más utilizados por las ventajas económicas y ambientales que representan, donde la formación de las AgNPs se hace a partir de extractos vegetales o el uso de hongos y bacterias (Singh *et al.*, 2017).

Las nanopartículas metálicas son ampliamente utilizadas como bactericidas y antifúngicos (Iravani *et al.*, 2014). La toxicidad de la plata depende de la concentración de iones libres activos (Ag⁺), encontrados principalmente en fase acuosa; las características del agua también reducen la toxicidad de las AgNPs impidiendo la formación de plata iónica (Ag⁺) que interactúe con la superficie libre reactiva de los organismos (Zhang *et al.*, 2016).

En la última década se ha extendido el uso de la Ag en la agricultura, en su forma iónica y como AgNPs; en particular, resultados del empleo de las AgNPs en agricultura son abordados en el siguiente apartado.

Nanopartículas de plata en la agricultura

La agricultura ha adoptado la nanotecnología por los muchos beneficios potenciales que representa en los procesos de control agrícola, especialmente en la mejora de la calidad y seguridad de los alimentos, la reducción de los insumos agrícolas, y en la absorción de nutrientes a nanoescala del suelo o en aplicaciones más específicas como son los nanofertilizantes y nanoplaguicidas (Prasad *et al.*, 2017). Entre los diferentes nanomateriales, las AgNPs están siendo ampliamente usadas en diversos productos, como agentes antimicrobianos, en el tratamiento de aguas residuales, en materiales de envasado de

alimentos, detergentes, aerosoles, etc. En consecuencia, a través de los lodos y el agua superficial, éstas pueden llegar fácilmente a las plantas sin que éste sea el objetivo (Rastogi *et al.*, 2017). Las AgNPs también han sido usadas para dar protección a las plantas contra patógenos, en la nutrición y el manejo agrícola debido a su tamaño nanométrico y a la alta relación superficie-volumen que presentan (Singh *et al.*, 2017).

La ventaja que presentan las AgNPs es que pueden ser suministrada en el suelo, a semillas, a las plantas vía raíz o vía foliar y por sus dimensiones nanoescalares, las plantas pueden absorberlas e incorporarlas al metabolismo con una dinámica totalmente diferente a los productos convencionales dentro de los que se encuentran las sales iónicas (Mishra, *et al.*, 2017).

Diversos estudios han reportado los efectos que las AgNPs tienen en plantas superiores. En frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays* L.), Salama (2012) reportó incrementos significativos en el crecimiento de los brotes y en la longitud de vástago, al tratar la semilla con dosis de AgNPs entre 20 y 60 mg L⁻¹. Respuestas positivas también del tratamiento con PVP-AgNPs (PVP, polivinipirrolidona) y AgNO₃ fueron observadas en *Eruca sativa*, al ocasionar el alargamiento de la raíz en plántulas (Vannini *et al.*, 2013). En *Brassica juncea*, Sharma *et al.* (2012a) también reportaron promoción del crecimiento cuando las plantas fueron tratadas con AgNPs provenientes de AgNO₃ en concentraciones que oscilaron de 10 a 40 mg L⁻¹. En *Panicum virgatum* y *Phytolacca americana* promovió el crecimiento significativo mayor con respecto al control (Yin *et al.*, 2012). En arroz, se ha observado que concentraciones bajas (hasta 30 µg mL⁻¹) de AgNPs promueven el crecimiento de raíces, ya que éstas solo están presentes superficialmente y no son absorbidas por las células de la raíz y por tanto no causan un efecto tóxico (Rastogi *et al.*, 2017). En maíz, el tratamiento con AgNPs en combinación con el campo magnético mejora el rendimiento cuantitativo (Berahmand *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha reportado que los efectos de las AgNPs en plantas superiores son en gran medida dependientes, además de la concentración, del tamaño y la forma de partícula de éstas. Algunos estudios indican que AgNPs de diámetro entre 35 y 40 nm influyen positivamente en el crecimiento de raíces y brotes de diferentes especies vegetales (Yin *et al.*, 2012). De acuerdo con Rastogi *et al.* (2017), el tratamiento en semillas de *Bacopa monnieri* con 100 mg L⁻¹ de AgNPs sintetizadas biológicamente (diámetros de partículas de 2 a 50 nm), tuvo un efecto significativo en la germinación e indujo la síntesis de proteínas y carbohidratos; por el contrario, se observó una disminución en el contenido de fenoles

totales y en la actividad de las enzimas catalasa y peroxidasa. Así también, AgNPs de mayor tamaño en concentraciones bajas tuvieron efecto positivo en las plantas.

Existen también reportes de efectos negativos de las AgNPs en el metabolismo vegetal. A continuación se presentan algunos de los efectos negativos de las AgNPs que fueron compilados por [Tripathi et al. \(2017b\)](#). En *Cucurbita pepo*, la aplicación de AgNPs con dimensiones mayores a 100 nm, suministradas a concentraciones de 500 mg L⁻¹, redujo la tasa de transcripción entre 64 y 84%, y se observó reducción en el peso de la biomasa. También en *C. pepo*, tratada con AgNPs en dosis de 250 a 750 mg L⁻¹, se observó una reducción en la tasa transpiratoria y en la biomasa, en comparación con el tratamiento con la concentración equivalente a partir de plata a granel en 49 y 91%, respectivamente. Toxicidad leve fue reportada en *Cucumis sativus* y *Lactuca sativa*, tratadas con AgNPs de 2 nm en dosis de 62, 100 y 116 mg L⁻¹. En experimento con *Lolium perenne*, *Hordeum vulgare* y *Linum usitatissimum*, con AgNPs con diámetro de partículas de 0.6, 2, y 5 nm a una concentración de 10 mg L⁻¹, se observó reducción en la germinación en 20%; mientras que, concentraciones de 20 mg L⁻¹, la reducción fue del 50%. Tanto en *Lolium perenne* como en *Hordeum vulgare* y en *Linum usitatissimum*, la longitud de vástago se reduce con los tratamientos con AgNPs.

En chícharo (*Pisum sativum*) se evidenció que la adición de 100 mM de óxido nítrico empleando como donador al nitroprusiato de sodio (SNP), mitiga de los efectos tóxicos que ocasionan las AgNPs a concentraciones de 1000 y 3000 µM; asimismo, reduce la acumulación de Ag en la planta y repara los daños en los tejidos. Los niveles de superóxido (SOR), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y malondialdehído (MDA) se incrementaron, pero la adición de SNP los redujo. También se observó que las AgNPs estimularon la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) e inhibieron la de las enzimas glutatión reductas (GR) y dehidrato-ascorbato reductasa (DHAR) ([Tripathi et al., 2017a](#)).

En semillas de *Linum usitatissimum*, el empleo de AgNPs de 20 nm a dosis de 20, 40, 60, 80 y 100 mg L⁻¹ no afectó germinación. En *Triticum aestivum*, la aplicación de AgNPs de 10 nm en concentraciones de 5 mg kg⁻¹ reduce la longitud de la raíz y el vástago, y promueve la acumulación de GSSG oxidado ([Tripathi et al., 2017b](#)). Tanto las AuNPs como AgNPs o los iones liberados a partir de éstas producen estrés que induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en algunas especies de plantas y que afectan la fotosíntesis ([Singh et al., 2016](#)). Con AgNPs de 10 y 20 nm, a una concentración de 20

mg L⁻¹, en *Hordeum vulgare* y *Lolium perenne* se reduce significativamente la longitud del vástago. En *Lolium multiflorum* aplicar dosis entre 1 y 40 mg L⁻¹ de AgNPs de 6 nm recubiertas con goma arábica, la toxicidad observada es dependiente de la dosis; observándose ésta en la reducción de la longitud de raíz y en el número de pelos radicales, y en la disminución del contenido de biomasa. *Populus deltoides nigra* tratada con 100 mg L⁻¹ de AgNPs de 25 nm, reduce en 87% la evapotranspiración; lo que en consecuencia causó un menor peso de biomasa fresca de hojas, tallo y raíces. En *Arabidopsis thaliana*, el suministro de AgNPs de 5 y 10 nm a una dosis de 1 mg L⁻¹; inhibió por completo el crecimiento de la raíz. Hortalizas como *Allium cepa* al recibir tratamiento con AgNPs de 24, 55 y 70 nm a concentraciones que van de 10, 80 hasta 100 mg L⁻¹, generan ROS que causan daño en la estructura del ADN y alteración de los cromosomas en metafase, que resultan en la ruptura de la pared celular y la muerte de la célula. En *Vicia faba*, el empleo de AgNPs de 60 nm a concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 mg L⁻¹, causa errores de replicación cromosómicas; y en arroz, concentraciones de 1,000 mg L⁻¹ AgNPs, ocasionan daño vacuolar en células de la raíz y ruptura de la pared celular (Tripathi *et al.*, 2017b).

Los estudios antes descritos, muestran que las AgNPs influyen en la morfología, la fisiología y en la bioquímica de plantas, con efectos tanto positivos como negativos, dependiendo éstos de la especie vegetal, las dimensiones y formas de las AgNPs, sus concentraciones y las moléculas con las que se asocian antes de ser suministradas a las plantas.

Para el uso de las AgNPs en la agricultura de forma más amplia, es necesario analizar los impactos de las mismas en cada uno de los componentes de los sistemas de producción, incluyendo los cuerpos de agua, los suelos, y los organismos vivos (Rastogi *et al.*, 2017), cuyos efectos aun no se conocen en su totalidad. Con estos considerandos, resulta estratégico realizar investigaciones más profundas que permitan aprovechar el potencial de las AgNPs como inductores de crecimiento, en la protección, y en la nutrición de las plantas, lo cual puede representar ventajas potenciales para el medio ambiente y los cultivos.

Referencias citadas

- Awika J. 2011. Major Cereal Grains Production and Use around the World. ACS Symposium Series, 1-13. doi: 10.1021/bk-2011-1089.ch001
- Aylmore MG, Muir DM. 2001. Thiosulfate leaching of gold. A review. *Minerals Engineering* 14(2): 135-174.
- Bernal, IN. 1996. Lixiviación de un mineral complejo de oro y plata utilizando tiosulfato de amonio. División de Ingeniería .Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, México.
- Cotton, FA. 2017. Transition element - Biological functions of transition metals | chemical element. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/transition-element/Biological-functions-of-transition-metals>
- FAO. 2017. Rice Market Monitor. Volume XX, Issue No. 3, Rome Italy
- García-Jiménez A, Trejo-Téllez L, Guillén-Sánchez D, Gómez-Merino F. 2018. Vanadium stimulates pepper plant growth and flowering, increases concentrations of amino acids, sugars and chlorophylls, and modifies nutrient concentrations. *PlosONE* 13(8): e0201908. doi: 10.1371/journal.pone.0201908
- Gnanamanickam SS. 2009. Rice and Its Importance to Human Life. *Prog. Biol.* 8: 1-11.
- Iravani SM, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9 (6): 385-406.
- Jiao X, Lyu Y, Wu X, Li H, Cheng L, Zhang, C. 2016. Grain production versus resource and environmental costs: towards increasing sustainability of nutrient use in China. *Journal of Experimental Botany*, 67(17): 4935-4949. doi: 10.1093/jxb/erw282
- Laborte A, Gutierrez M, Balanza J, Saito K, Zwart S, Boschetti M. 2017. RiceAtlas, a spatial database of global rice calendars and production. *Scientific Data* 4: 170074. doi: 10.1038/sdata.2017.74
- Medina Hernández P, Mejía Silva MT. 2015. Monografía de la Plata. Ag. Servicio Geológico Mexicano. México.
- Mishra S, Keswani C, Abhilash P, Fraceto L, Singh H. 2017. Integrated Approach of Agri-nanotechnology: Challenges and Future Trends. *Frontiers in Plant Science* 8: 471. doi: 10.3389/fpls.2017.00471

- Muthayya S, Sugimoto J, Montgomery S, Maberly G. 2014. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of The New York Academy Of Sciences* 1324(1): 7-14. doi: 10.1111/nyas.12540
- Prasad R, Bhattacharyya A, Nguyen Q. 2017. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1014. doi: 10.3389/fmicb.2017.01014
- Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, Kalaji H, He X, Mbarki S, Brestic M. 2017. Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Plant: A Critical Review. *Frontiers in Chemistry* 5: 78. doi: 10.3389/fchem.2017.00078
- Ray D, Mueller N, West P, Foley J. 2013. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *Plos ONE* 8(6): e66428. doi: 10.1371/journal.pone.0066428
- Renner H, Schlamp G, Zimmermann K, Weise W, Tews P, Dermann K. 2001. Silver, Silver Compounds, and Silver Alloys. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. doi: 10.1002/14356007.a24_107).
- Salama HMH. 2012. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology* 3(10): 190-197.
- Sharma P, Bhatt D, Zaidi M, Saradhi P, Khanna P, Arora S. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(8): 2225-2233. doi: 10.1007/s12010-012-9759-8
- SIAP. 2016. Anuario estadístico. Disponible en <http://www.infosiap.siap.gob.mx> Accesado el 20 de diciembre de 2017.
- Singh P, Kim Y, Zhang D, Yang D. 2016. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology* 34(7): 588-599. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006
- Tripathi D, Singh, S, Singh S, Srivastava P, Singh V, Singh S. 2017a. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 167-177. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.06.01
- Tripathi D, Tripathi A, Shweta SS, Singh Y, Vishwakarma K. 2017b. Uptake, Accumulation and Toxicity of Silver Nanoparticle in Autotrophic Plants, and Heterotrophic Microbes: A Concentric Review. *Frontiers in Microbiology* 08: 07. doi: 10.3389/fmicb.2017.00007

- Urzúa-Abarca DA, Fuentes-Aceituno JC, Uribe-Salas A. 2012. Estudio Termodinámico-Voltamperométrico De La Lixiviación de Plata En Soluciones De Tiosulfato-Amoniacado Mediante La Técnica De Los Electrodo de Pasta de Carbono, Departamento de Ing. Metalúrgica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Salttillo, Coahuila, 25900, México.
- Vannini C, Domingo G, Onelli E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, Bracale M. 2013. Morphological and Proteomic Responses of *Eruca sativa* Exposed to Silver Nanoparticles or Silver Nitrate. *Plos ONE* 8(7): e68752. doi: 10.1371/journal.pone.0068752
- Yin, L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES. 2012. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS ONE* 7(10): e47674. doi: 10.1371/journal.pone.0047674
- Zhang X, Liu Z, Shen W, Gurunathan S. 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9), 1534. doi: 10.3390/ijms17091534

CAPÍTULO I. NANOPARTÍCULAS DE PLATA, EN LA GERMINACIÓN,

CRECIMIENTO INICIAL Y VEGETATIVO EN PLÁNTULAS

DE ARROZ (*Oriza Sativa L.*) CV. MORELOS A-98

1.1. Resumen

Concentraciones bajas las nanopartículas de plata (AgNPs) pueden ejercer efectos positivos en la germinación de semillas y en la promoción del crecimiento inicial en plantas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las AgNPs en variables fisiológicas, bioquímicas y nutrimentales durante los procesos de germinación de semillas, el crecimiento inicial de plántulas y desarrollo vegetativo de arroz cv. Morelos A-98. En un primer experimento para las fases de germinación y crecimiento inicial se evaluaron AgNPs a 40, 80 y 120 mg L⁻¹; etanol al 70%; Benomilo; y un control. La evaluación del desarrollo vegetativo de plantas se hizo en un segundo experimento en un sistema hidropónico de raíz flotante, en el que a la solución nutritiva se adicionaron 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs y las plantas estuvieron expuestas a los tratamientos 32 días. La exposición de las semillas a 40, 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs estimuló la germinación, en tanto que 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs promovieron el crecimiento inicial de las plántulas en el primer experimento. Durante el desarrollo vegetativo se observó que la aplicación de AgNPs en cualquiera de las concentraciones probadas disminuye altura de planta, longitud y volumen de raíz, así como número de macollos, y en consecuencia, tanto el peso de la biomasa fresca como seca se reducen. La aplicación de AgNPs no afectó concentración intercelular de CO₂ ni tasa transpiratoria, pero al aplicar 20 mg L⁻¹ AgNPs aumentaron conductancia estomática y tasa fotosintética. En vástago, los tratamientos no afectaron las concentraciones de N, P y Ca, en tanto que las de K y Mg disminuyeron y S aumentó solo con 20 mg L⁻¹ AgNPs, y luego disminuyó. La concentración de Fe fue mayor al control en todos los tratamientos de AgNPs, aunque las de Cu disminuyeron; todos los demás micronutrientes se mantuvieron similares al control en este tejido analizado. En raíz las concentraciones de N y P incrementaron con la aplicación de AgNPs, pero las de K disminuyeron en tanto que las de Ca, Mg y S no fueron afectadas; las de Fe y Cu aumentaron significativamente. Las acumulaciones de N, P, K, Ca, Mg y S en vástago disminuyeron, mientras que la acumulación de Fe aumentó significativamente en

presencia de AgNPs. En raíz las acumulaciones de N y P no fueron afectadas, en tanto que las de K, Ca, Mg y S disminuyeron significativamente, y las de Fe y Cu aumentaron en plantas tratadas con AgNPs. Las AgNPs redujeron las concentraciones de clorofilas vástago, aumentaron las concentraciones de aminoácidos en raíces y disminuyeron las concentraciones de azúcares totales en vástagos. Las concentraciones de prolina en vástagos aumentaron drásticamente con la aplicación de AgNPs, pero se conservaron estables en raíces.

Palabras clave: Poaceae, *Oryza sativa*, nanotecnología, AgNPs, desinfestación, germinación, crecimiento, concentración nutrimental, acumulación nutrimental.

1.2. Introducción

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los tres cereales más importantes a nivel mundial, y aporta el 21% de calorías y el 15% de proteínas en la dieta humana. Actualmente se cultiva en aproximadamente 163 millones de ha al año en más de 100 países, y el 90% del arroz del mundo se consume en Asia [1].

En México se cuenta con más de 4 mil productores de arroz, principalmente en los estados de Nayarit, Tamaulipas, Veracruz, Michoacán y Campeche. La producción anual de este cereal es de 236 mil toneladas y se espera que puedan crecer a 350 mil para el 2018 con la finalidad reducir en 20% las importaciones [2].

Para el cultivo del arroz se requiere del establecimiento de almácigos, cuyo buen manejo puede significar ahorros del 25 al 30% en el costo de producción [3]. Para lograr un buen almácigo la calidad de la semilla y su manejo son factores que determinan el éxito del cultivo en fases posteriores, y la nanotecnología puede ofrecer una alternativa viable para lograr mayor germinación y reducir incidencias de agentes patógenos.

En el terreno de las nanotecnologías, Las nanopartículas de plata (AgNPs) han mostrado actividad estimulante del crecimiento y antimicrobiana de amplio espectro [4,5]. En general, las AgNPs se inmovilizan con agentes de recubrimiento, que suelen ser especies cargadas negativamente o polímeros hidrófilos relativamente grandes, tales como citrato, dextrano, goma arábica, polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP). Entre éstos, la PVP es un reactivo atractivo y comúnmente utilizado que puede estabilizar y proteger mediante enlaces esteresas las AgNPs [6].

En concentraciones bajas las AgNPs pueden estimular la germinación de semillas y promover el crecimiento de plantas. En mostaza (*Brassica juncea*) la aplicación de 25 y 50 mg L⁻¹ de AgNPs ocasionó mayor altura y longitud de raíz, y mayor producción de biomasa [7]. En cacahuate (*Arachis hypogaea*), las AgNPs mejoran la velocidad de germinación en semillas. Los efectos benéficos de éstas podrían atribuirse a una mayor producción de enzimas responsables de reacciones metabólicas clave. Por otra parte, las AgNPs podrían incrementar los niveles de ácido indolacético (AIA), en raíces o brotes, que a su vez pueden incrementar el vigor de las semillas y por ende el crecimiento de plántula [8]. En arroz, la aplicación de 60 mg L⁻¹ AgNPs favoreció la concentración de clorofila *a* y carotenoides [9]. En frijol

(*Phaseolus vulgaris*) y maíz (*Zea mays*) las aplicaciones de 20-60 ppm de nanopartículas de plata incrementaron la concentración de clorofilas *a*, *b*, total y carotenoides [10].

En relación con el efecto de las AgNPs en la nutrición vegetal, se han reportado incrementos en las concentraciones de N, Mg y Fe con aplicaciones de 100 y 200 mg L⁻¹ AgNPs en brotes de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) [11]. En trigo (*Triticum aestivum*) variedad NARC-2009 la aplicación de 25 ppm AgNPs aumentó el uso eficiente de N, P y K [12].

En maíz, la aplicación de 60 ppm AgNPs favoreció la concentración de carbohidratos, mientras que en frijol el contenido de proteínas incrementó con esa misma concentración de AgNPs [10]. En tomate (*Solanum lycopersicum*) al aplicar 75 y 100 mg L⁻¹ AgNPs se observaron mayores concentraciones de aminoácidos, entre ellos de glutamina y asparagina [13]. En arroz la aplicación de AgNPs aumenta la concentración de prolina [14].

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) en la desinfestación, germinación de semillas, crecimiento temprano y respuestas fisiológicas, bioquímicas y nutrimentales de plántulas de arrozcv. Morelos A-98 crecidas en condiciones hidropónicas en invernadero.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Material vegetal

Para evaluar el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) en variables fisiológicas, bioquímicas y nutrimentales durante los procesos de germinación de semillas, crecimiento inicial de plántulas, y desarrollo vegetativo de plantas de arroz se utilizaron semillas del cultivar arroz Morelos A-98 (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) obtenidas del Banco de Nacional de Germoplasma de Arroz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Zacatepec, Morelos, México.

1.3.2. AgNps-PVP de Agrovit

Las nanopartículas de plata (AgNPs) aplicadas en este estudio son de la marca comercial Agrovit. Estas AgNPs contienen 1.2% plata metálica y 18.8% de polivinilpirrolidona (PVP); son de morfología esferoide, con un diámetro promedio de 35 nm caracterizadas, con una variación de 1 a 90 nm. El

diámetro hidrodinámico de las AgNPs con PVP es de 70, con un potencial zeta de -15 mV, una resonancia de plasmones de superficie 420 nm y una estructura de PVP confirmada por transformada infrarroja Fourier por (FTIR) [15].

1.3.3. Aplicación de AgNPs en germinación de semillas

En la germinación de semillas se evaluaron seis tratamientos. El tratamiento 1 (T1) fue el control, representado por semillas sin desinfectar, lavadas solamente con agua destilada (AD) estéril durante 15 minutos. En el tratamiento 2 (T2) las semillas estuvieron inmersas en una solución de 40 mg L⁻¹ AgNPs (AgroVit) por 12 min. En el tratamiento 3 (T3) las semillas fueron expuestas a 80 mg L⁻¹ AgNPs y en el tratamiento 4 (T4) a 120 mg L⁻¹ AgNPs igualmente por 12 min. El tratamiento 5 (T5) consistió en el lavado de las semillas con una solución de etanol al 70% por 10 min, después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, y posteriormente se incubaron por 1 h en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% con 0.025 g de Tween 20. El tratamiento 6 (T6) consistió en la inmersión de la semilla en una solución de Benomilo (C₁₄H₁₈N₄O₃, 1-benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo) al 50% a una concentración de 2 g en 100 mL de agua durante 1 h (500 g de i. a. kg⁻¹). Al final, para todos los tratamientos, las semillas se dejaron secar sobre papel filtro estéril en campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Para evaluar la germinación, las semillas se colocaron en contenedores plásticos transparentes desechables, con dimensiones de 11x11x8 cm, sobre papel filtro de 10x10 cm con 15 mL de agua destilada estéril. Cada 48 h se adicionaron 15 mL de agua destilada estéril para mantener la humedad. Las cajas se depositaron en oscuridad a 28 °C por 3 días, después fueron expuestas a la luz natural. Se tuvieron tres repeticiones por tratamiento mismas que fueron distribuidas completamente al azar. La unidad experimental fue el contenedor de plástico transparente con 10 semillas.

Durante los primeros seis días después del establecimiento de los tratamientos se contabilizó el número de semillas germinadas, y a los 10 días las plántulas fueron medidas y cosechadas para evaluar el efecto de los tratamientos en el crecimiento inicial después de la germinación.

1.3.4. Aplicación de AgNPs en el desarrollo vegetativo de plantas

Para evaluar el efecto de las AgNPs en el desarrollo vegetativo de las plantas de arroz se estableció un segundo experimento en hidroponía. Para ello, las semillas se lavaron con una solución de etanol al 70% por 10 min, después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, y posteriormente se incubaron por 1 h en una solución de NaClO al 5% con 0.025 g de Tween 20. Al final, las semillas se secaron sobre papel filtro estéril en una campana de flujo laminar.

Una vez desinfectadas semillas de arroz se colocaron en medio MS (Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany) suplementado con 3% (w/v) sacarosa (J. T. Baker; Philadelphia, PA, USA) y solidificado con 0.8% agar (Merck; Darmstadt, Germany) en frascos de cristal, mismo que se mantuvieron a oscuridad a 28 °C por 3 d; exponiéndose a luz ambiental por otros 14 d; finalmente, las plántulas se trasladaron a un sistema hidropónico [16], en contenedores plásticos con un volumen de 8 L de solución nutritiva Yoshida (1.43 mM NH₄NO₃, 1.00 mM CaCl₂ 2H₂O, 1.64 mM MgSO₄ 7H₂O, 1.32 mM K₂SO₄, 320 μM NaH₂PO₄, 100 μM Fe-EDTA, 7.99 μM MnCl₂ 4H₂O, 0.15 μM ZnSO₄ 7H₂O, 0.15 μM CuSO₄ 5H₂O, 0.08 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O y 1.39 μM H₃BO₃) esto de acuerdo con Moreno-Alvarado et al. (2017) [17]. Dos semanas (14 d) después del trasplante se suministraron 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs a la solución nutritiva. La solución nutritiva se reemplazó completamente cada 8 d y cada tercer d se ajustó el pH de la solución a 5.5 utilizando H₂SO₄ o NaOH 1 N. El experimento se llevó a cabo en invernadero, a una temperatura promedio de 28 °C/15 °C (día/noche), humedad relativa de 60% con 16 h luz (159 μmol m⁻² s⁻¹) y 8 h oscuridad.

Para evaluar los parámetros de crecimiento las plantas de arroz se establecieron en un sistema hidropónico de raíz flotante en solución Yoshida. A la solución nutritiva se adicionaron dosis crecientes de AgNPs: 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ durante 32 días, cuando las plantas habían alcanzado los 46 días de edad.

1.3.5. Variables evaluadas

1.3.5.1. Porcentaje de germinación de semillas

Para evaluar el porcentaje de germinación se registraron las semillas germinadas cada 24 h durante 6 días, considerando como semilla germinada aquella con radícula de 2 mm de longitud.

1.3.5.2. Crecimiento inicial de plántulas

Durante el crecimiento inicial se evaluaron longitud de vástago y raíz de plántulas con apoyo del software de procesamiento de imágenes digitales ImagenJ versión 1.50i del *National Institutes of Health* (Bethesda, MD, USA) [18]. Diez días después de la aplicación de tratamientos, las plántulas fueron separadas en vástago y raíz para determinar su longitud, peso de la materia fresca (PMF) y peso de la materia seca (PMS). El peso de la materia seca se determinó 48 h después de secar las muestras a 70 °C en una estufa de aire forzado.

1.5.3. Producción de biomasa fresca y seca

A los 32 d después de aplicados los tratamientos (plantas de 46 días de edad), las plantas se cosecharon, se lavaron con agua destilada y se midió altura, longitud y volumen de raíz y número de macollos. Las plantas se separaron en vástago y raíz, se registraron el peso la biomasa fresca, y el peso de biomasa seca después de se secarse en estufa de aire forzado (Riossa HCF-125; Monterrey, Mexico) a 72 °C por 72 h.

1.5.4. Intercambio gaseoso o fotosíntesis

A plantas de 45 d de edad con 31 d de tratamientos de AgNPs, se midieron parámetros de intercambio gaseoso como Concentración intercelular (C_i) de CO_2 , Tasa transpiratoria (E), Conductancia estomática (G_s), y Tasa fotosintética (A), sobre hojas maduras y no senescentes de plantas de arroz, mediante un equipo PP Systems CIRAS-2 (Amesbury, MA, USA) de acuerdo con Reynolds (2012) [19].

1.5.5. Concentraciones y acumulaciones nutrimentales

Del material vegetal seco cosechado a los 32 días después del inicio de la aplicación de los tratamientos, para el análisis de las concentraciones y acumulaciones nutrimentales se tomaron 0.25 g de tejido seco de vástago y raíz, se sometieron a digestión húmeda con una mezcla de $H_2SO_4:HClO_4$ (2:1, v:v) de

acuerdo con la metodología descrita por Alcantar y Sandoval (1999) [20]. Estos extractos se analizaron mediante un equipo de espectroscopía de emisión óptica de inducción por plasma acoplado (Varian ICP OES 725-ES; Mulgrave, Australia). La determinación de N se realizó por el método de semimicro-Kjeldahl [21].

1.5.6. Concentraciones de clorofilas

La cuantificación de las concentraciones de clorofila se realizó por el método de Geiger *et al.* (1998) [22]. Para ello se tomaron 60 mg de tejido fresco de vástagos y raíces, y se procedió con una extracción etanólica secuencial de (80, 80 y 50%) incubadas en baño María a 80 °C durante 20 min cada una y centrifugadas a 14000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes extraídos de una misma muestra se concentraron en un mismo embace. Las concentraciones de clorofilas *a* y *b*, se cuantificaron por espectrofotometría (Jenway 6715; Staffordshire, UK) a partir de los extractos de vástago, a 635 y 645 nm.

La concentración de aminoácidos libres totales para vástago y raíz se realizó utilizando el método deninhidrina [23], a una longitud de onda de 570 nm en la que se empleó L-leucina (Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany) para la curva estándar.

1.5.7. Concentración de azúcares totales

La determinación de las concentraciones de azúcares totales se realizó de acuerdo a Bailey (1958) [24]. Para ello se pesaron 500 mg de tejido fresco de vástago y raíz, se maseraron y se les agregó un volumen 50 mL de etanol (80%) en ebullición constante con leve agitación; después de filtrado, a 1 mL del extracto se le agregaron 5 mL de antrona 0.4% (w/v) en H₂SO₄ concentrado (Merck; Darmstadt, Germany), usando hielo para disminuir la temperatura la reacción. Posteriormente los extractos fueron calentados a 95 °C en baño María durante 15 min, y después se colocaron en hielo. Se usó glucosa (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) para elaborar la curva estándar y las muestras fueron leídas a una absorbancia de 600 nm.

1.3.6. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza, así como la comparación de medias con la prueba de LSD, con un nivel de significancia de 0.05, empleando los procedimientos estadísticos del paquete estadístico SAS 9.3 [25].

1.4. Resultados

1.4.1. Las AgNPs estimulan la germinación en arroz

En la **Figura 1.1** se presenta la cinética de germinación de semillas de arroz expuestas a diferentes tratamientos. Se observa que los tratamientos de desinfestación de las semillas con 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs redujeron el tiempo de germinación y aumentaron el porcentaje de germinación, dado que se alcanzó el 100% en solo 4 d. Por el contrario, en semillas desinfestadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, alcanzaron 63.3% de germinación en 6 d. Semillas del tratamiento control (agua destilada) lograron 93.3% después de 6 d.

Es posible observar que la inmersión de semillas de arroz en soluciones conteniendo 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 12 minutos promovieron la germinación un 50% a partir del día 3 después de la siembra y un crecimiento inicial de la parte aérea de 40.47 %, con un comportamiento similar al observado en semillas tratadas con el fungicida Benomilo; concentraciones de 120 mg L⁻¹ AgNPs incrementaron la velocidad de germinación un 38.72%, y promovieron el crecimiento de plántulas.

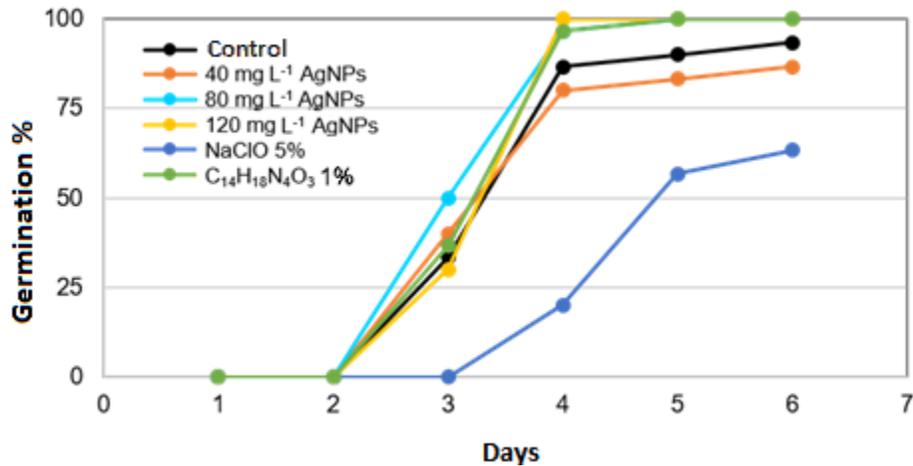


Figura 1.1. Cinética de germinación de semillas de arroz cv. Morelos A-98, tratadas con diferentes métodos de desinfección.

1.4.2. Concentraciones medias de AgNPs estimula la producción de biomasa de vástago y raíz en etapas iniciales de crecimiento de plántulas de arroz

Después de 10 d del establecimiento de las semillas, se evaluaron parámetros de crecimiento inicial en las plántulas. En la **Figura 1.1** se observa que con todos los tratamientos de desinfección de semillas, excepto el NaClO 5%, se obtuvo un crecimiento del vástago superior al control. Entre el control y el tratamiento con NaClO al 5%, no existieron diferencias significativas en el crecimiento o del vástago (**Figura 1.2**).

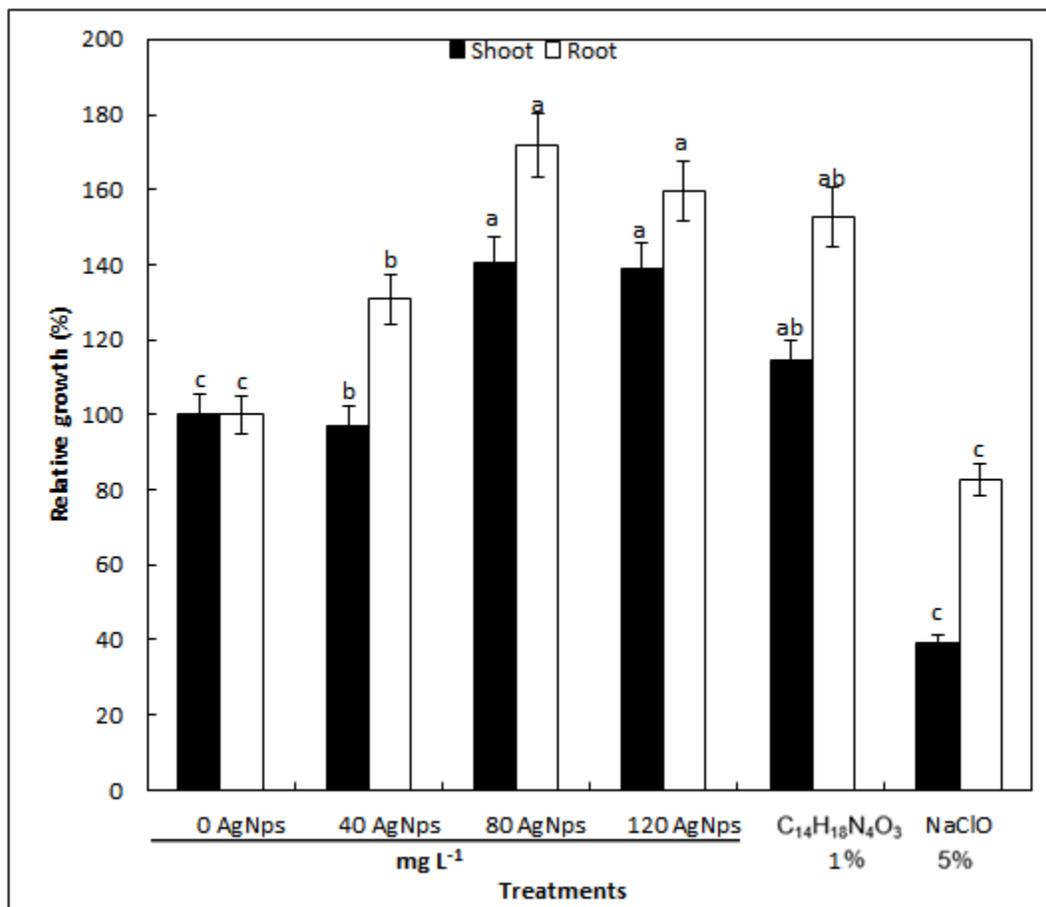


Figura 1.2. Crecimiento relativo inicial de plántulas de arroz cv. Morelos A-98 en respuesta a tratamientos de desinfección de semillas con nanopartículas de plata, Benomilo (1%) e hipoclorito de sodio (5%) en condiciones de laboratorio. Medias \pm DE con letras distintas en cada órgano, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05).

En los tratamientos con 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs el crecimiento inicial del vástago fue superior en 40.47 y 38.72%, respectivamente; mientras que, el Benomilo (C₁₄H₁₈N₄O₃) fue de 14.32% y con hipoclorito de sodio (NaClO) éste se redujo en 60.7%, en todos los casos respecto al control (**Figura 1.2**).

La longitud de raíz fue estadísticamente superior al control y al resto de los tratamientos con 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs. Los incrementos relativos en el crecimiento de la raíz en estos tratamientos fueron del orden de 40.5 y 38.8%, respectivamente; mientras que el tratamiento con C₁₄H₁₈N₄O₃ al 1% aumentó en 14.3%. Los tratamientos 40 mg L⁻¹ AgNPs y NaClO al 5% redujeron el crecimiento de la raíz en 3.4 y 60.9 %, respectivamente.

En la **Figura 1.3** se observa como la concentración de 80 mg L⁻¹ AgNPs estimuló mayor crecimiento de vástago y raíz, que se corrobora los pesos de la materia fresca (**Figura 1.4a**) y seca (**Figura 1.4b**) de vástago y raíz. Estos resultados posiblemente se deban a que las AgNPs pueden acelerar el metabolismo del almidón almacenado en las semillas de arroz porque inducen la absorción de agua más rápido en el proceso de hidratación. En un experimento similar, la aplicación de 10 y 20 mg L⁻¹ AgNPs a semillas de arroz aumentó significativamente (2.6 y 2.5 veces, respectivamente) la actividad de α -amilasa en comparación con las semillas control, así como el contenido de azúcares solubles totales [26].

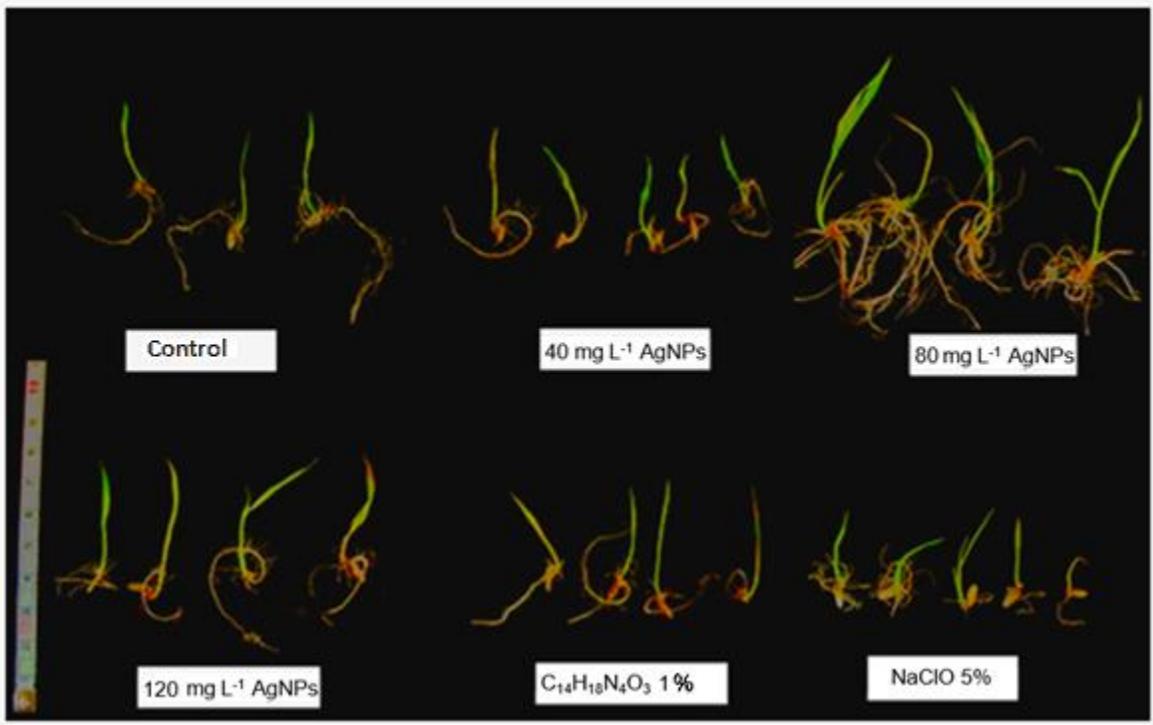
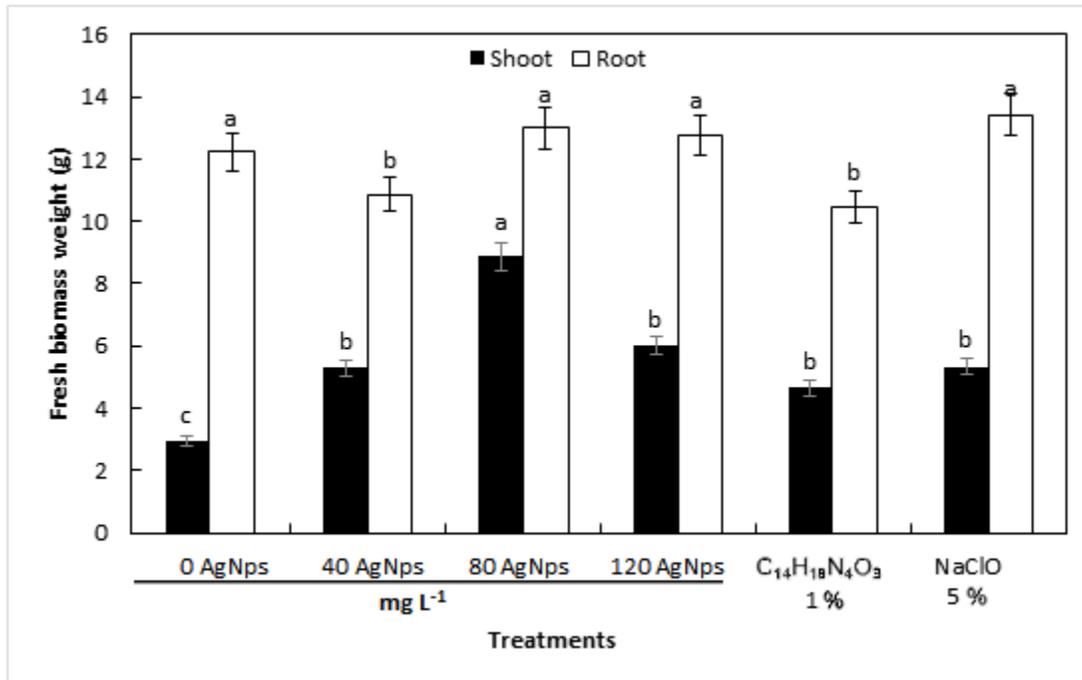


Figura 1.3. Crecimiento inicial de arroz Morelos A-98 tratadas con AgNPs a concentración de 40, 80 y 120 mg L⁻¹, hipoclorito de sodio (5%) y Benomilo (1%).

a)



b)

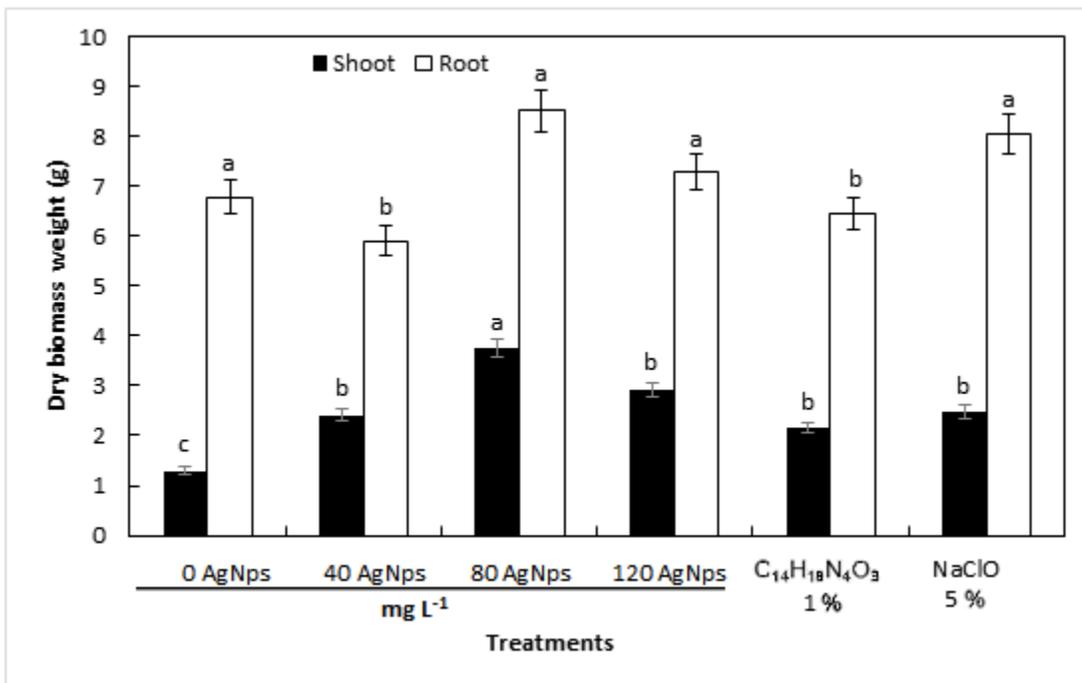


Figura 1.4. Peso de biomasa fresca (a) y seca (b) de vástago y raíz de plántulas de arroz cv. Morelos A-98 provenientes de semillas desinfectadas con nanopartículas de plata, hipoclorito de sodio (5%) y

Benomilo (1%). Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas (LSD, 0.05).

Al observar el comportamiento del crecimiento entre tejidos evaluados es posible establecer que las raíces son más sensibles que los vástagos a la aplicación de los tratamientos, tanto en la producción de materia fresca como seca (**Figuras 1.4a y 1.4b**). La aplicación de 80 mg L⁻¹ AgNPs produjo la media más alta para peso de biomasa tanto fresca como seca de vástago, seguido de la aplicación de 120 mg L⁻¹ AgNPs, aunque ambos fueron estadísticamente similares al control y a NaClO. Las medias más bajas para esta variable se observaron en plantas tratadas con 40 mg L⁻¹ AgNPs y Benomilo. Respecto a raíz, las medias más altas para peso de biomasa fresca y seca se observaron en plantas tratadas con 80 mg L⁻¹ AgNPs. El control presentó la media más baja con comparación con el resto de los tratamientos (**Figura 1.4a y 1.4b**).

1.4.3. Las AgNPs afectan negativamente el crecimiento de plantas de arroz en fase vegetativa

En nuestro experimento en hidroponía para evaluar el efecto de las AgNPs en el crecimiento vegetativo, expusimos las plantas de arroz de 14 días de edad a dosis crecientes de PVP-AgNPs (0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹) a partir de Argrobit, las cuales se adicionaron a la solución nutritiva. Las plantas estuvieron expuestas a estos tratamientos durante 32 días. Observamos que la aplicación de estas nanopartículas disminuyó las variables altura de planta, longitud de raíz, volumen de raíz y número de macollos (**Figura 1.5**).

En cuanto a altura de planta (**Figura 1.5a**) y longitud de raíz (**Figura 1.5b**) todos los tratamientos con AgNPs fueron estadísticamente inferiores al control, con el valor más bajo observado en plantas expuestas a 80 mg L⁻¹ AgNPs, el cual fue un 16.11% menor respecto al control (**Figura 1.5a**). Por otro lado, el volumen de raíz (**Figura 1.5d**) y el número de macollos (**Figura 1.5d**) también fueron inferiores al control, aunque en ambos casos no hubo diferencias entre los tres tratamientos donde se aplicaron las AgNPs.

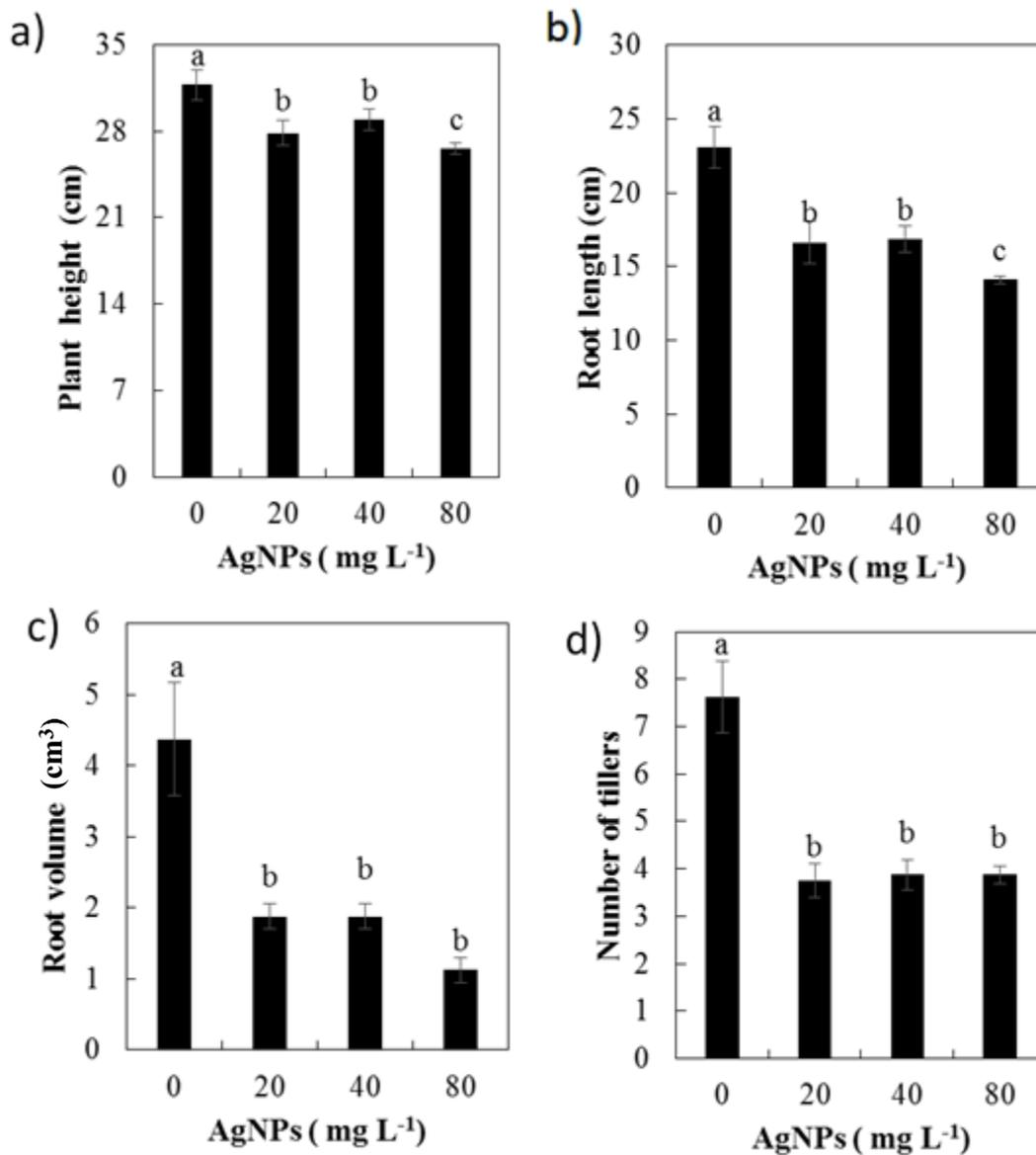
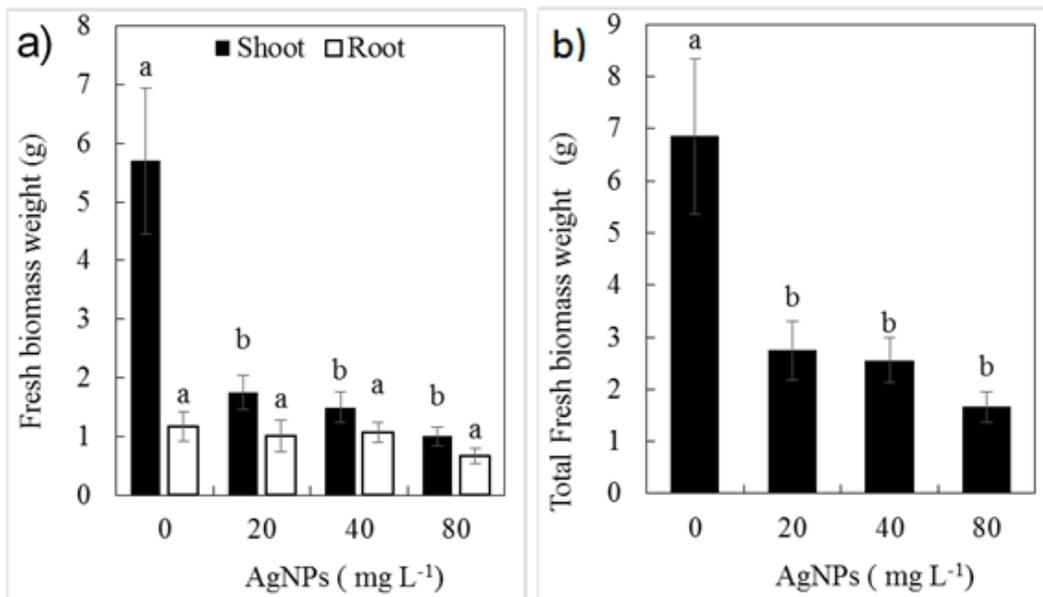


Figura 1.5. Indicadores de crecimiento vegetativo de plantas de arroz expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs a partir de PVP-AgNPs. Altura de planta (a), longitud de raíz (b), número de macollos (c) y volumen de raíz (d). Plantas de 46 d de edad fueron crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 32 días. Medias ± DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas entre tratamientos (LSD, 0.05).

El peso de biomasa fresca de raíz disminuyó 13.96, 8.71 y 43.19% respecto al control, al aplicar 20, 40 u 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente. En vástago, la disminución del peso de la biomasa fresca fue de

46.53, 48.48 y 64.36% al aplicar 20, 40 u 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente, en comparación con el control (**Figuras 1.6a y 1.6b**).

De la misma manera, el peso de biomasa seca de vástagos y raíz disminuyó en un 67.99, 73.58 y 83.53% con los tratamientos de 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente (**Figura 1.6c**), siendo diferente al control desde el punto de vista estadístico, a partir de la concentración de 20 mg L⁻¹ AgNPs. Este mismo comportamiento se observó para biomasa seca total (**Figura 1.6d**).



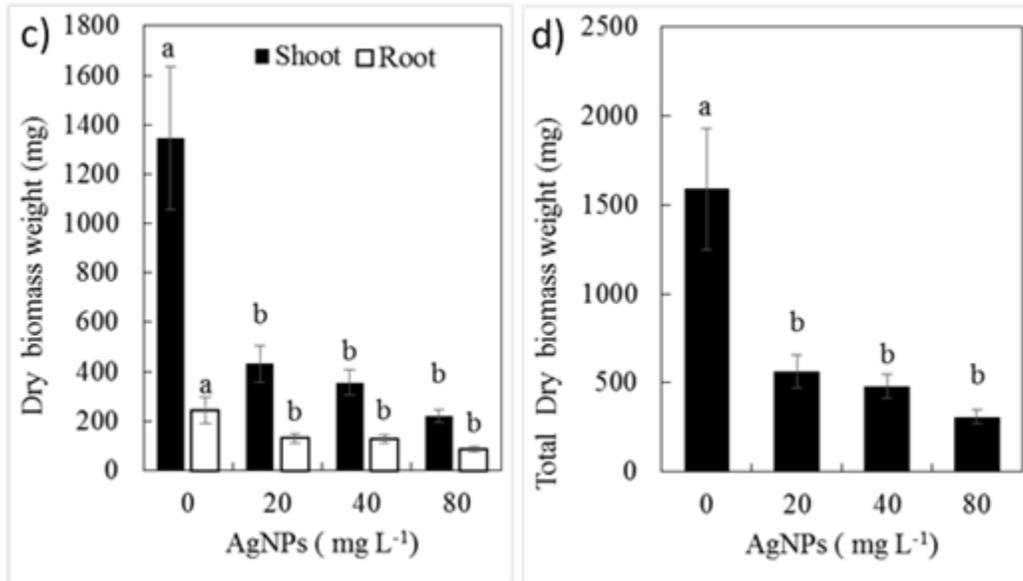


Figura 1.6. Producción de biomasa de plantas de arroz en respuesta a la aplicación de diferentes concentraciones de AgNPs a partir de PVP-AgNPs. Peso de biomasa fresca de vástagos y raíces (a) Peso de biomasa fresca total de plantas (b), peso de biomasa seca de vástagos y raíces (c) y peso de biomasa seca total de plantas (d). Plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas durante 46 d a concentraciones de 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ de nanopartículas de plata (AgNPs) en la solución nutritiva Yoshida. Medias \pm DE en cada subfigura con letras distintas indican diferencias estadísticas (LSD, 0.05).

En la [Figura 1.7](#) se muestra una fotografía que ilustra la morfología que exhibieron las plantas al finalizar el experimento.

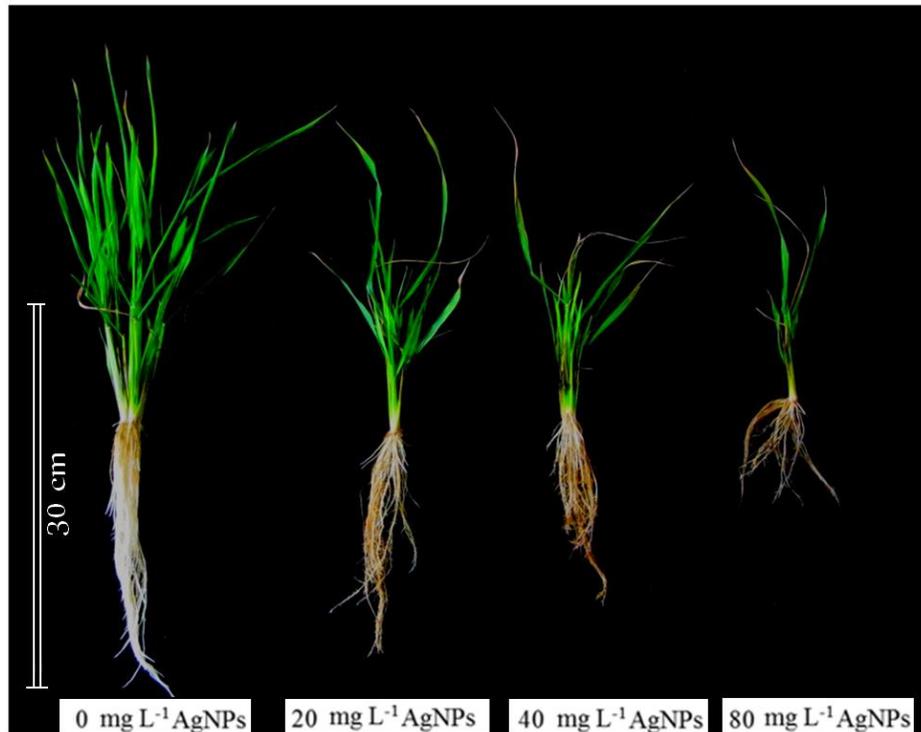


Figura 1.7. Morfología de plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas durante 32 d a concentraciones de 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ de nanopartículas de plata (AgNPs) en la solución nutritiva Yoshida al finalizar el experimento, después de 32 días de exposición a AgNPs.

1.4.4. A bajas concentraciones, las AgNPs estimulan algunos indicadores fotosintéticos en arroz

Los tratamientos de AgNPs no presentaron diferencias significativas para los parámetros concentración intracelular de oxígeno (Ci) (**Figura 1.8a**) ni tasa transpiratoria (E) (**Figura 1.8b**), aunque numéricamente se apreció un ligero incremento al aplicar 20 mg L⁻¹ AgNPs. Conductancia estomática (Gs) (**Figura 1.8c**) y tasa fotosintética (A) (**Figura 1.8d**) incrementaron con aplicaciones de 20 mg L⁻¹ AgNPs, pero conforme aumentó la dosis de AgNPs estos parámetros mostraron diferencias significativas disminuyendo con respecto al control. De hecho, la media más alta se observa en plantas tratadas con 20 mg L⁻¹ AgNPs fue estadísticamente diferente a las observadas en el resto de los tratamientos, incluyendo al control.

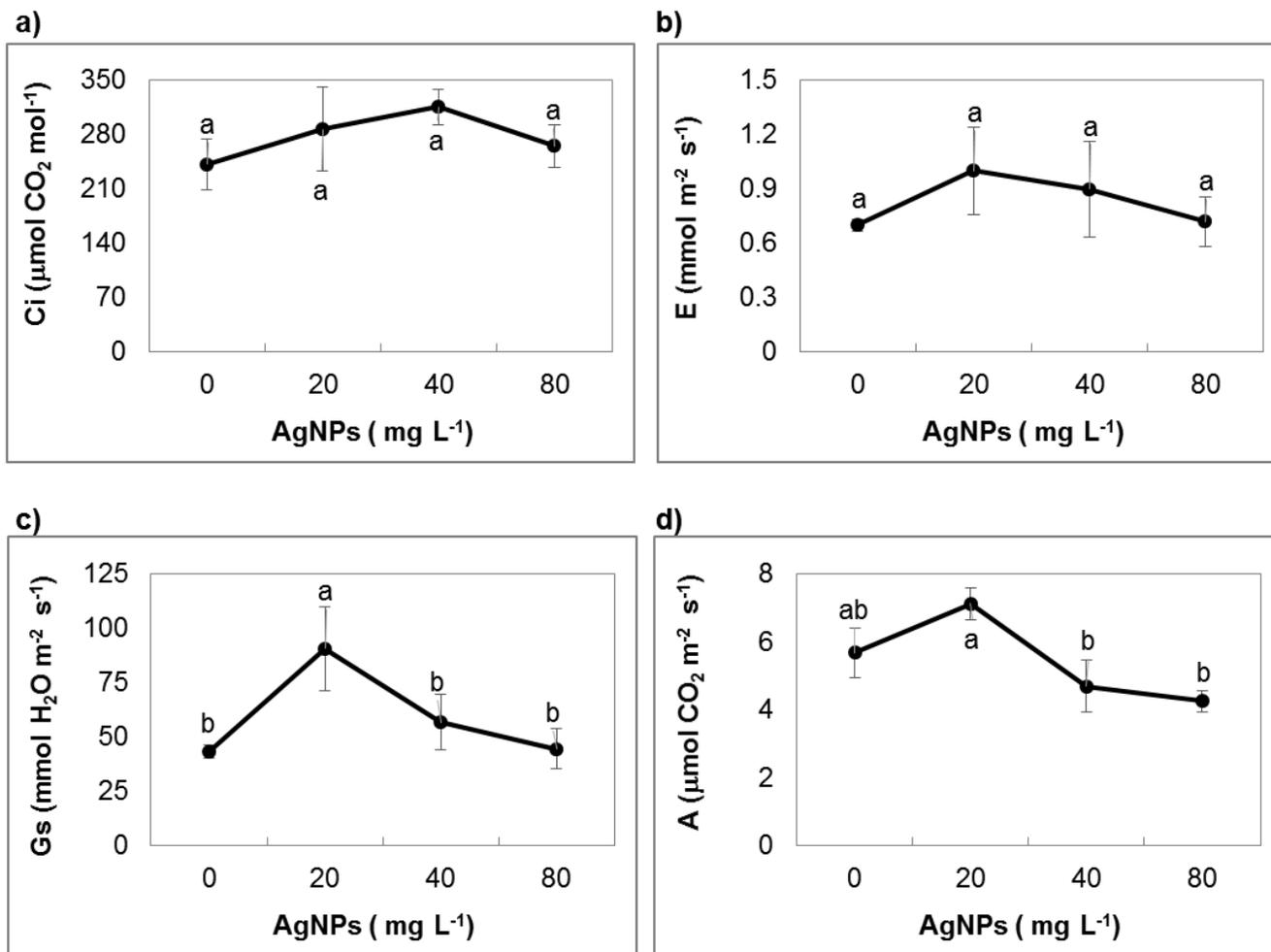


Figura 1.8. Parámetros de intercambio gaseoso en plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas durante 32 días con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) en la solución nutritiva. a) Ci=Concentración intercelular de CO_2 . b) E=Tasa transpiratoria. c) Gs= Conductancia estomática. d) A= Tasa fotosintética. Medias \pm DE en cada subfigura con letras distintas indican diferencias estadísticas (LSD, 0.05).

1.4.5. Las AgNPs estimulan la concentración de algunos nutrientes en tejido vegetal

Con la finalidad de identificar una posible interacción entre la absorción de AgNPs y los nutrientes esenciales, se determinó la concentración de macronutrientes, micronutrientes y plata iónica en

vástago y raíz de plantas de arroz cv. Morelos A-98 crecidas en diferentes concentraciones de AgNPs durante 46 d.

Las concentraciones de N, P y Ca en vástagos no observaron diferencias estadísticas entre tratamientos (**Figuras 1.9a, 1.9b y 1.9c**). Respecto a K y Mg las mayores concentraciones prevalecieron en el control, con una disminución para K de 12.71, 22.83 y 23.29% y 11.46, 26.92 y 22.53% para Mg, en plantas tratadas con 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente, en comparación con el control (**Figuras 1.9d y 1.9e**). La aplicación de 20 mg L⁻¹ AgNPs aumentó la concentración de S en 52.34% respecto al control, mientras con 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs las concentraciones de este elemento disminuyeron en 27 y 23.4% respecto al tratamiento con 20 mg L⁻¹ AgNPs (**Figura 1.9f**). Es importante notar que 20 mg L⁻¹ AgNPs, concentraciones de S en vástago, aumentó significativamente, y aplicaciones de 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, las concentraciones de S en vástago fueron mayores respecto al control y menores respecto a 20 mg L⁻¹ AgNPs.

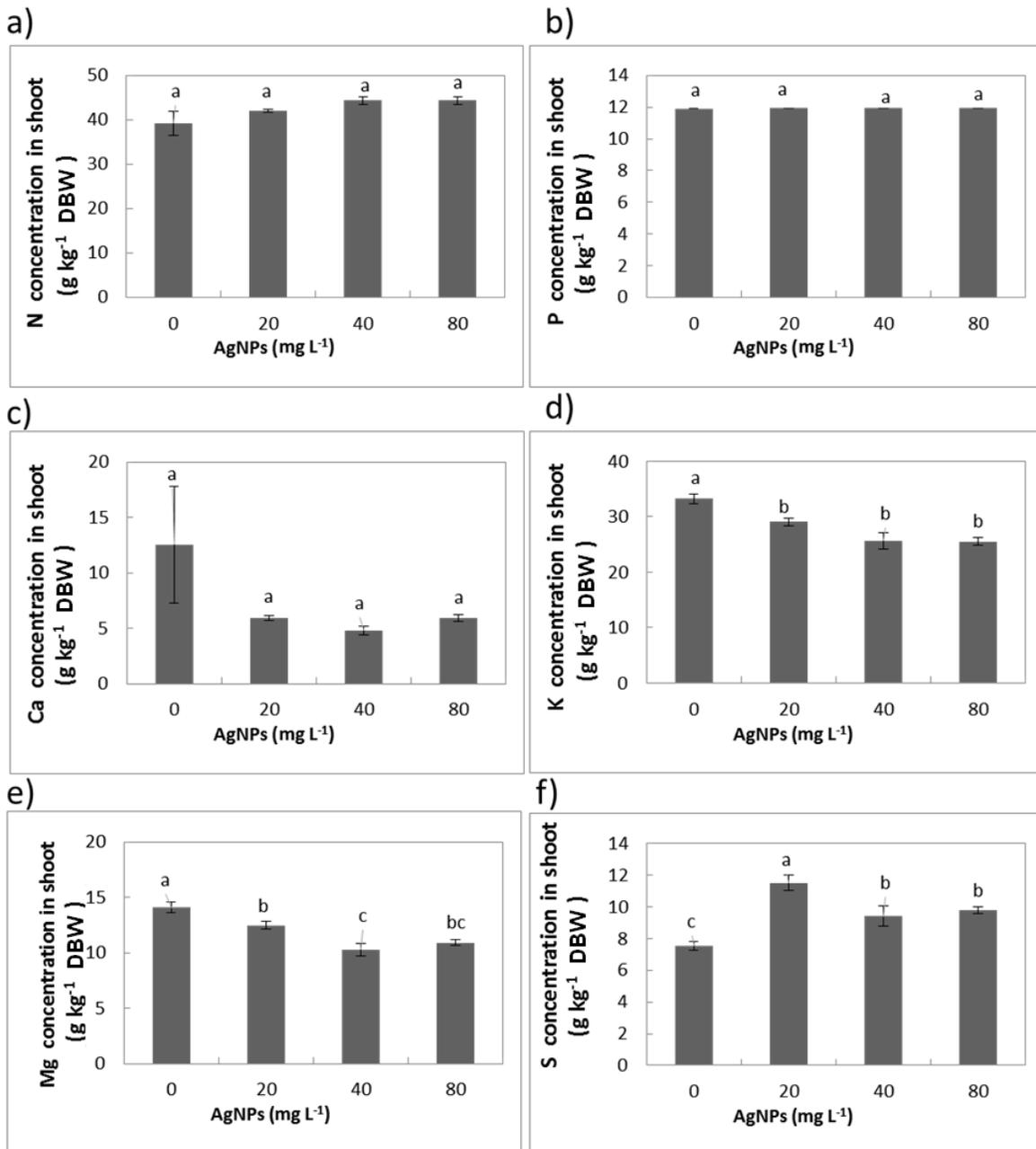


Figura 1.9. Concentración de macronutrientos en vástagos de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs a partir de PVP-AgNPs en solución. Medias ± DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

En relación con los micronutrientes en vástagos de arroz, los tres tratamientos de AgNPs incrementaron la concentración de Fe respecto al control, los cuales fueron 185.49, 93.28 y 158.94% más altos que el control para 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente (**Figura 1.10a**). Las concentraciones de Cu, Zn y B no observaron efectos significativos de los tratamientos probados (**Figura 1.10b** y **1.10c**), aunque numéricamente se apreciaron reducciones para Cu y aumentos para Zn y B. Las aplicaciones de 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs redujeron las concentraciones de Mn, en tanto que al aplicar 20 mg L⁻¹ AgNPs se mantuvo una concentración de Mn similar al control (**Figura 1.10d**).

Las concentraciones de plata iónica aumentaron al aplicar 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs respecto al control, y aunque también hubo un aumento numérico en la concentración de este metal al aplicar 20 mg L⁻¹ AgNP, este valor fue estadísticamente similar al control, pero superior al observado en plantas expuestas a 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs (**Figura 1.10f**).

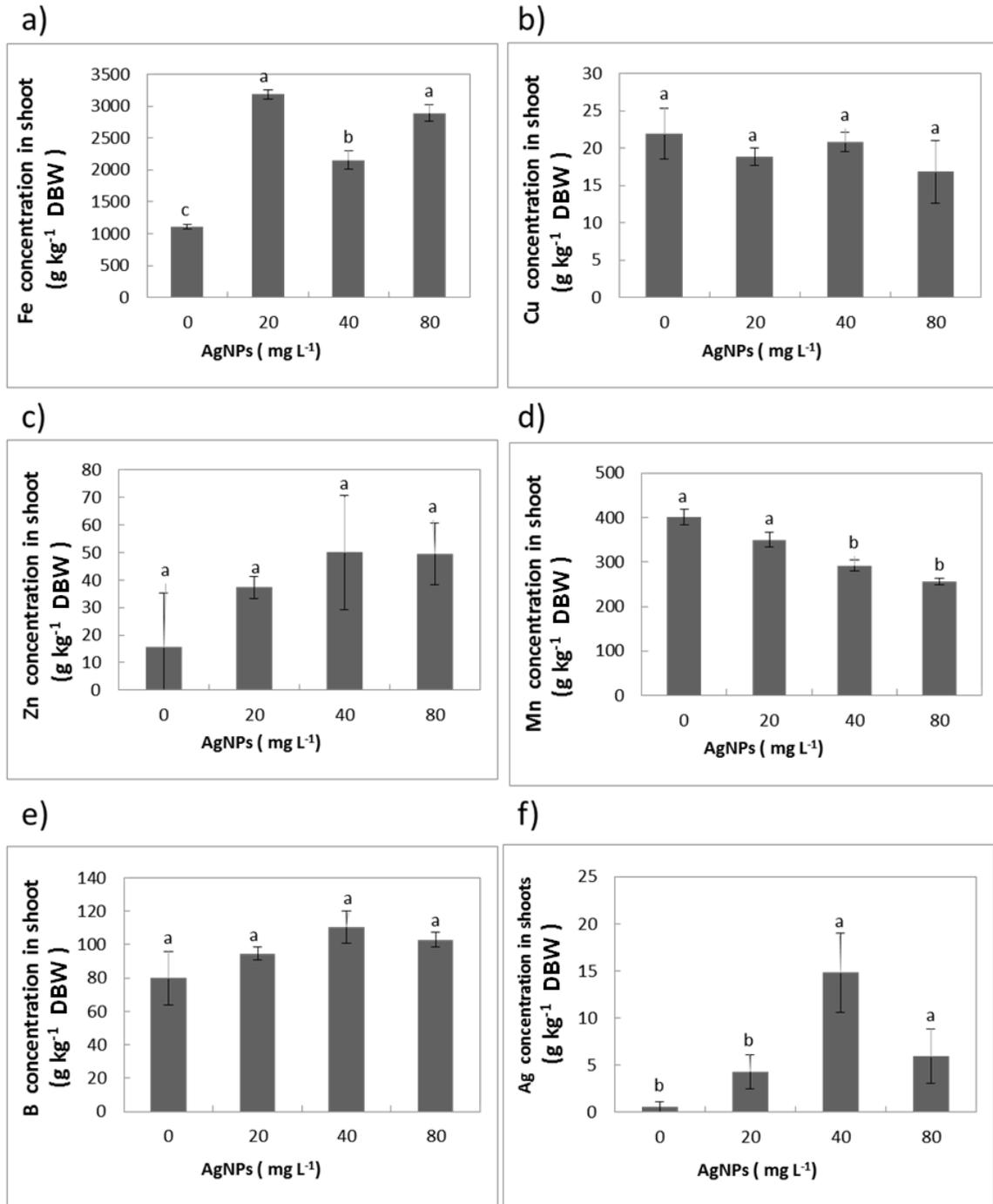


Figura 1.10. Concentración de micronutrientos y Ag en vástagos de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

En raíz, las concentraciones de N y P aumentaron en plantas expuestas a AgNPs. Para el caso de N, los aumentos fueron de 46.53, 14.85 y 75.25% en plantas expuestas a 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs respectivamente, en comparación con el control. Para P, los aumentos fueron de 21.25, 53.03 y 84.33% para plantas expuestas a 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente, en comparación con el control (**Figuras 1.11a y 1.11b**). Las concentraciones de Ca, Mg y S no fueron afectadas por los tratamientos (**Figuras 1.11d, 1.11e y 1.11f**), en tanto que las de K disminuyeron en 56.41, 47.83 y 42.32% en plantas expuestas a 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente, en comparación con el control (**Figura 1.1c**).

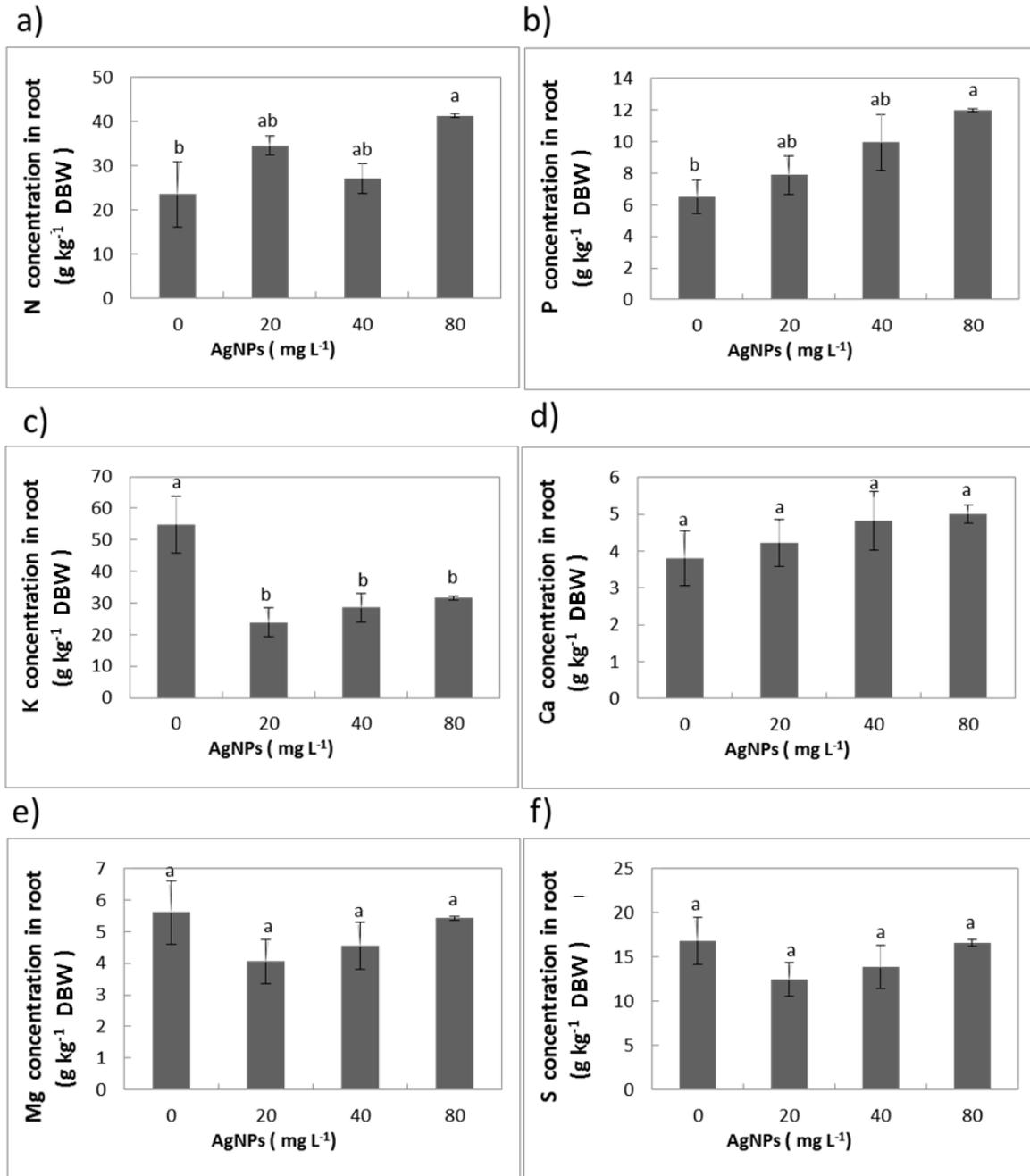


Figura 1.11. Concentración de macronutrientos en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

En raíz, las concentraciones de Fe y Cu aumentaron en plantas tratadas con AgNPs respecto al control. Para el caso de Fe, los aumentos respecto al control fueron de 183.46, 185.47 y 250.61% en plantas tratadas con 20,40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente. Para Cu, los aumentos fueron de 153.59, 159.97 y 271.15% en plantas expuestas a 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente, en comparación con el control (**Figuras 1.12a y 1.12b**). Las concentraciones de Zn, Mn y B no fueron afectadas por la aplicación de AgNPs (**Figuras 1.12c, d y e**).

La concentración de plata iónica aumentó significativamente con 80 mg L⁻¹ AgNPs respecto a los demás tratamientos, y aunque al aplicar 20 y 40 mg L⁻¹ AgNPs no se observaron diferencias respecto al control, numéricamente hubo mayor concentración de Ag en plantas expuestas a estos últimos tratamientos en comparación con el control. También fue posible observar que la concentración de Ag fue mayor en raíz que en vástago (**Figuras 1.10f y 1.12f**).

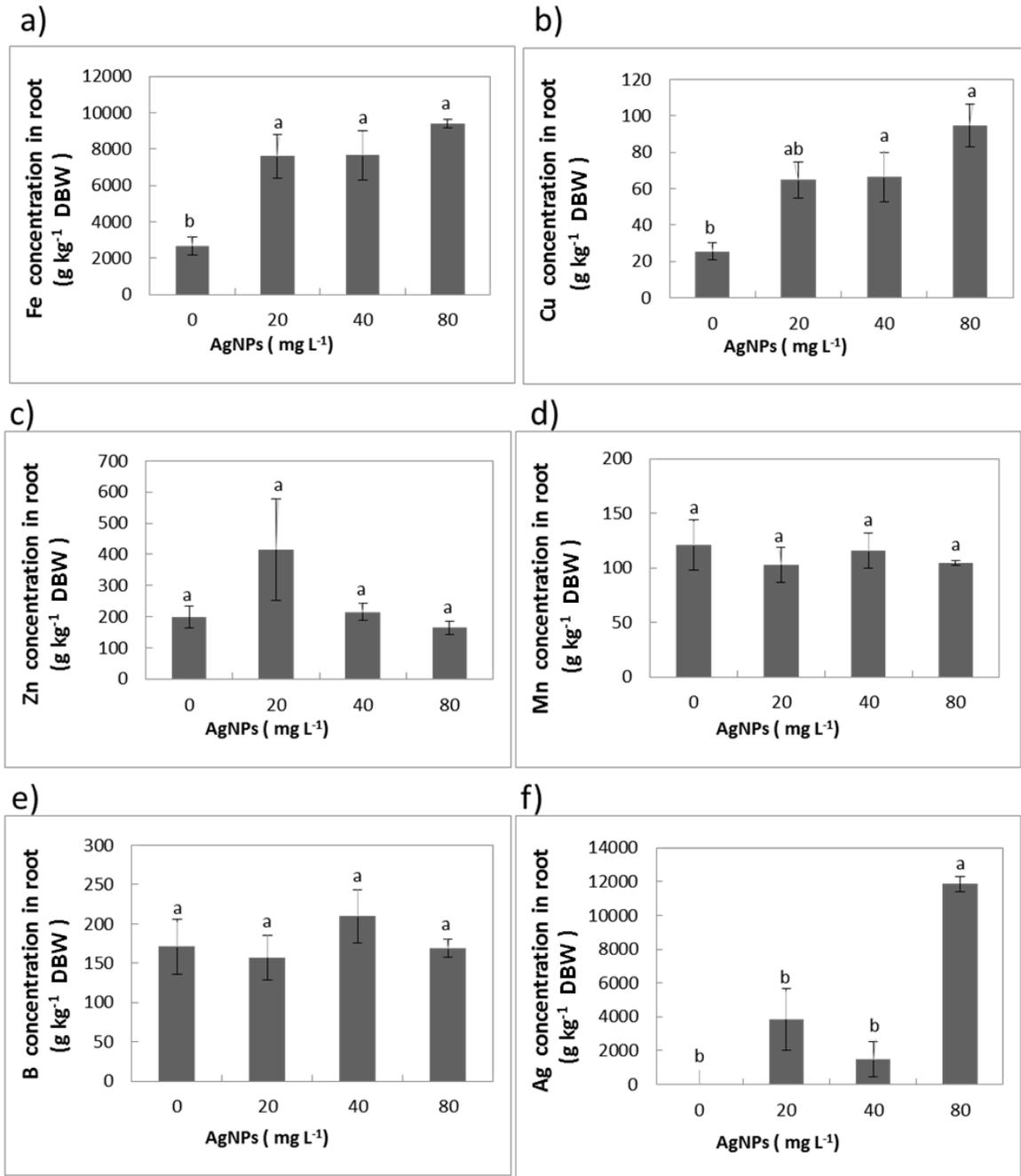


Figura 1.12. Concentración de micronutrientos y Ag en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs). Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

1.4.6. Las AgNPs disminuyen las acumulaciones de macronutrientes y mantienen estables las de micronutrientes

En vástago, los valores promedio de acumulación de N, P, K, Ca, Mg y S disminuyeron en todos los casos en plantas tratadas con AgNPs respecto al control (**Figura 1.13**). Por el contrario, las medias de acumulación de Fe en plantas expuestas a AgNPs aumentaron respecto al control, pero se mantuvieron estables las de Cu, Zn, y B. En general, las acumulaciones de Mn disminuyeron en todos los tratamientos de AgNPs, pero las diferencias fueron significativas respecto al control solo en plantas expuestas a 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs (**Figura 1.14**).

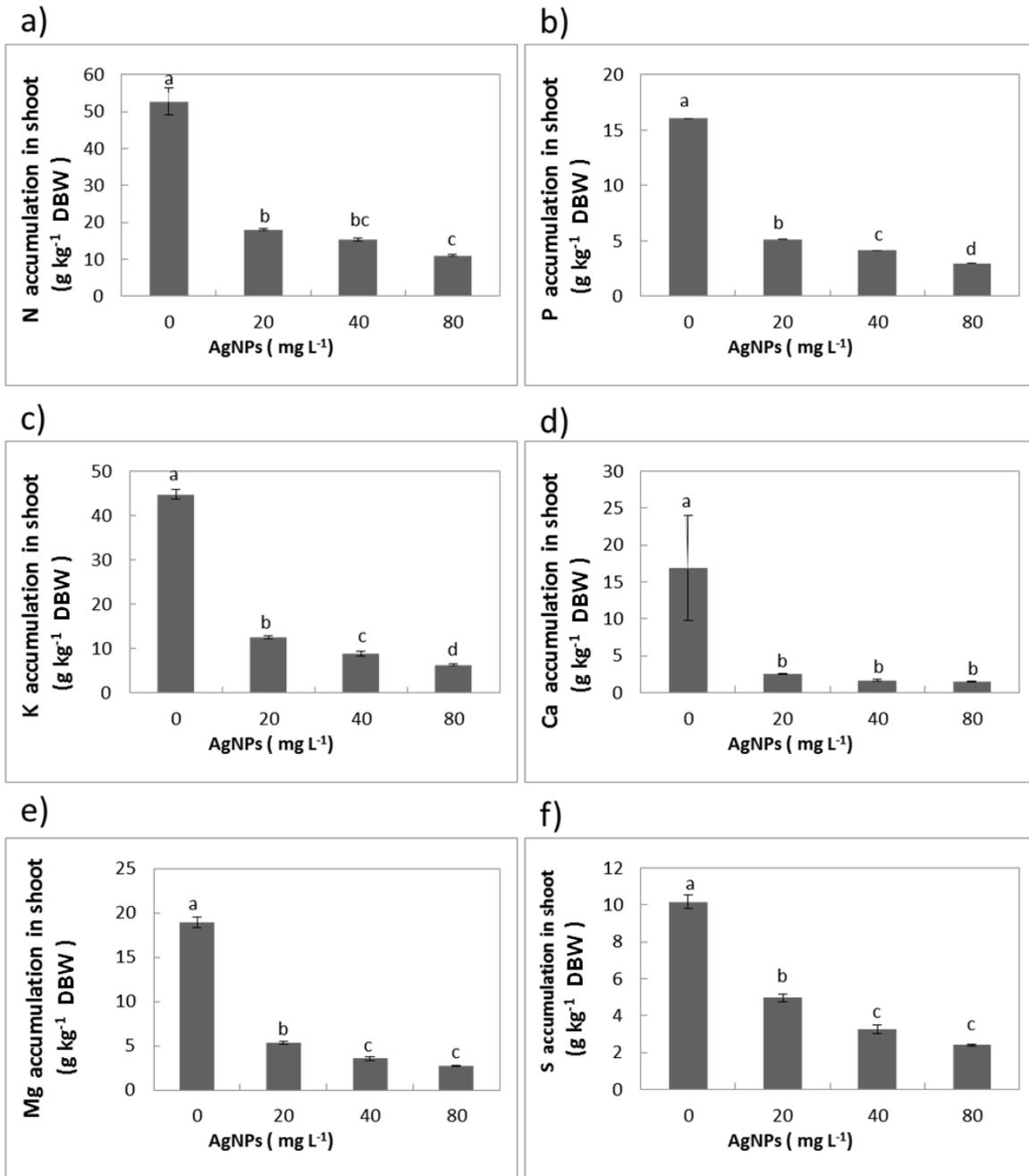


Figura 1.13. Acumulación de macronutrientos en vástago de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

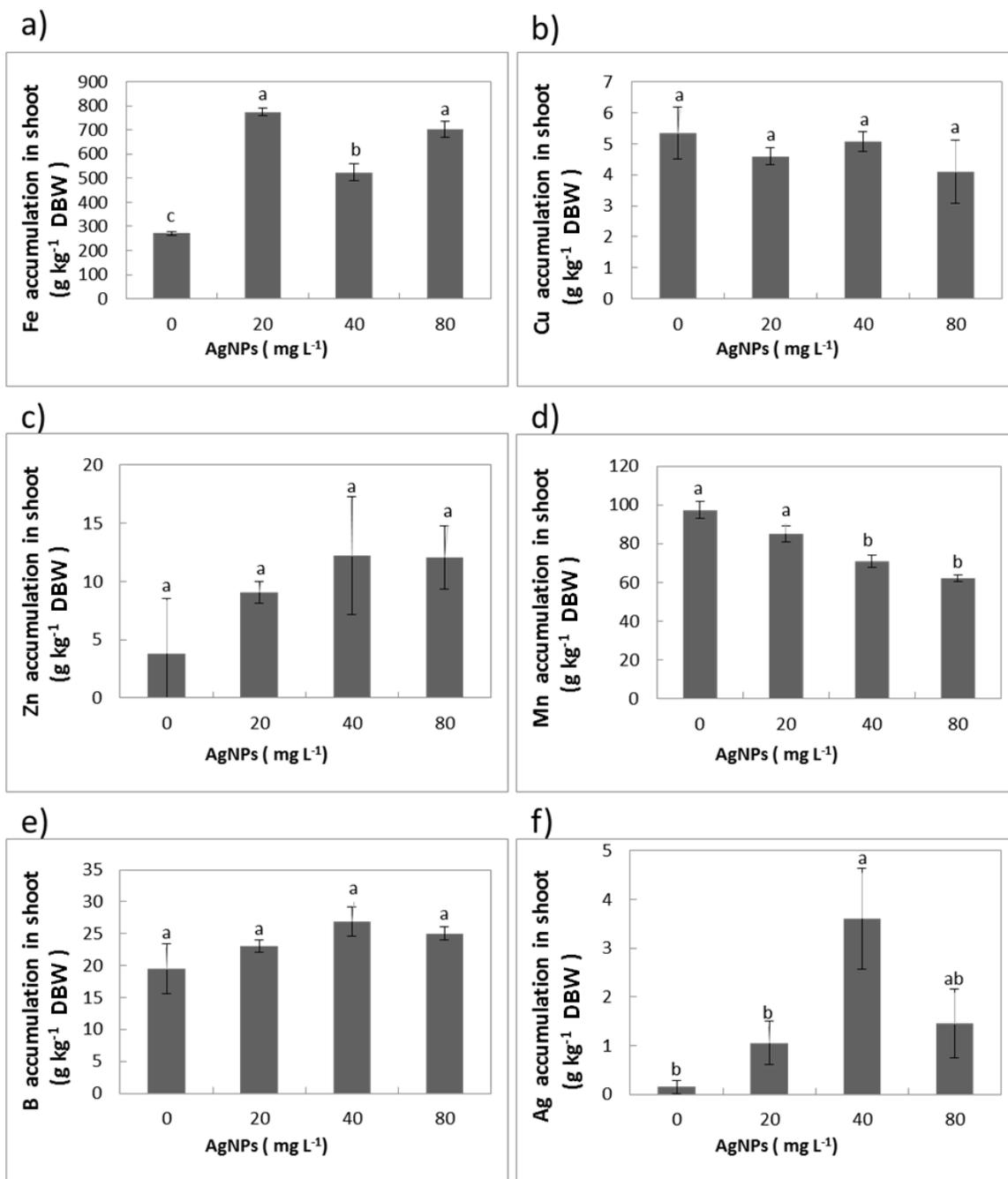


Figura 1.14. Acumulación de micronutrientes y Ag en vástago de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

La acumulación de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) en vástago de arroz fue afectada por la aplicación de AgNPs disminuyendo significativamente, en dosis de 20, 40, y 80 mg L⁻¹ AgNPs (**Figura 1.13**) que corresponden en un 65.70, 70.93 y 79.15% para N; 67.97, 74.28 y 81.55% para P; 72.06, 80.16 y 85.86% para K; 84.84, 90.12 y 91.25% para Ca; 71.66, 81.21 y 85.72% Mg; y 51.24, 67.99 y 76.16% para S.

La concentración de Ag en vástago y raíz se relacionó de manera positiva con la concentración de AgNPs en la solución nutritiva. Asimismo, la concentración de Ag fue mayor en raíz en concentraciones de 80 que en vástago (**Figura 1.10f**).

El valor promedio de la acumulación de plata iónica aumentó al incrementar la concentración de AgNPs en la solución nutritiva, aunque las diferencias fueron significativas solamente en plantas expuestas a 40 mg L⁻¹ AgNps respecto al control (**Figura 1.14f**).

Para raíces, los valores promedio de acumulación de N y P no fueron afectados por los tratamientos de AgNPs respecto al control (**Figuras 1.15a y 1.15b**). Por otra parte, los promedios de acumulación de K, Ca, Mg y S disminuyeron significativamente en plantas tratadas con AgNPs respecto a las plantas control (**Figuras 1.15c, 1.15d, 1.15e y 1.15f**). Por el contrario, las acumulaciones de Fe y Cu aumentaron en plantas tratadas con AgNPs (**Figuras 1.16a y 1.16b**), en tanto que las de Zn, Mn y B se mantuvieron similares en todos los tratamientos evaluados (**Figuras 1.16c, 1.16d y 1.16e**).

Los valores de acumulación de Ag fueron estadísticamente superiores al control en plantas tratadas con 80 mg L⁻¹ AgNPs. Aunque numéricamente los valores promedio de acumulación de Ag en plantas expuestas a 20 y 40 mg L⁻¹ AgNPs fueron superiores al control, la prueba estadística muestra medias similares (**Figura 1.16f**).

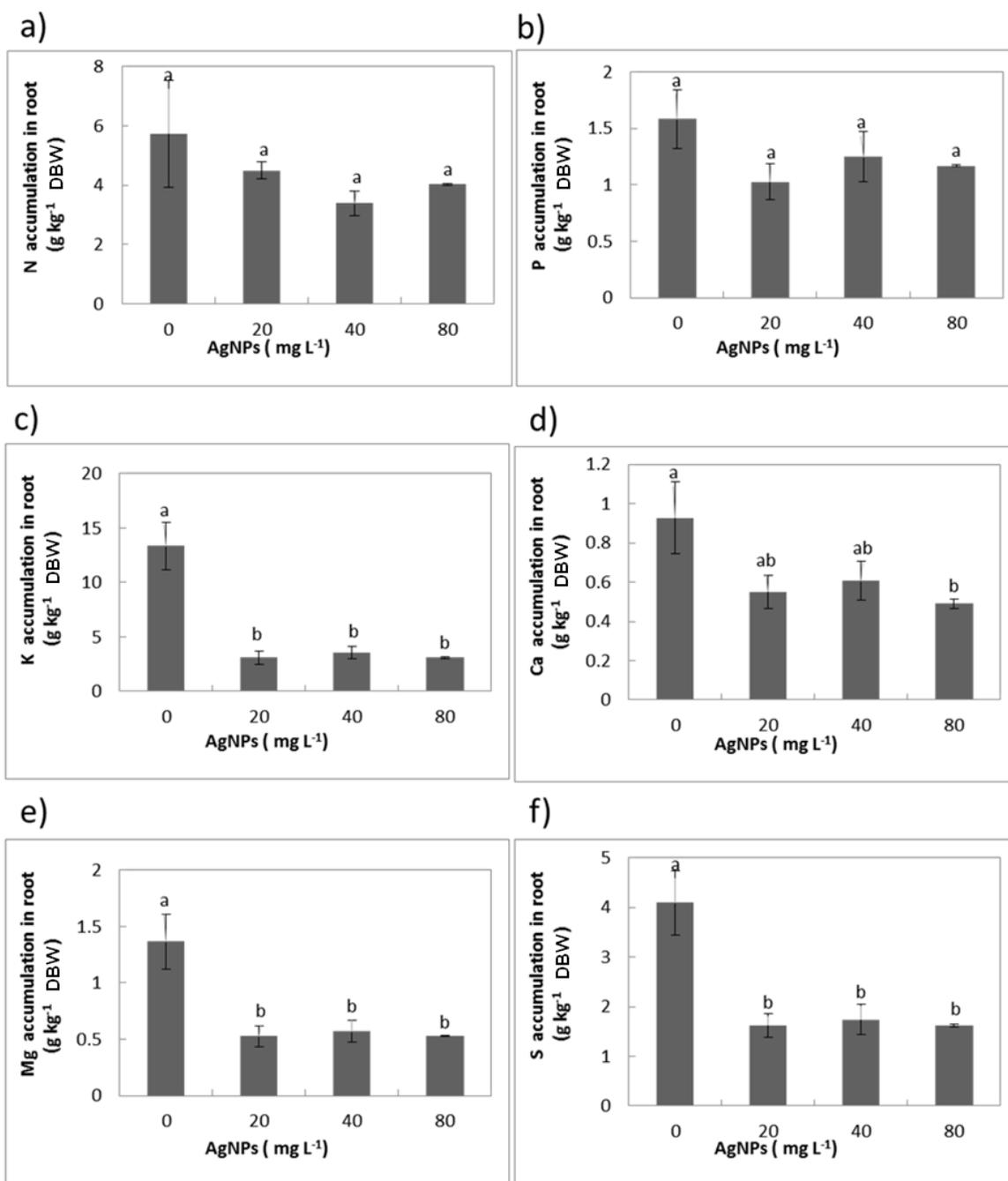


Figura 1.15. Acumulación de macronutrientos en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

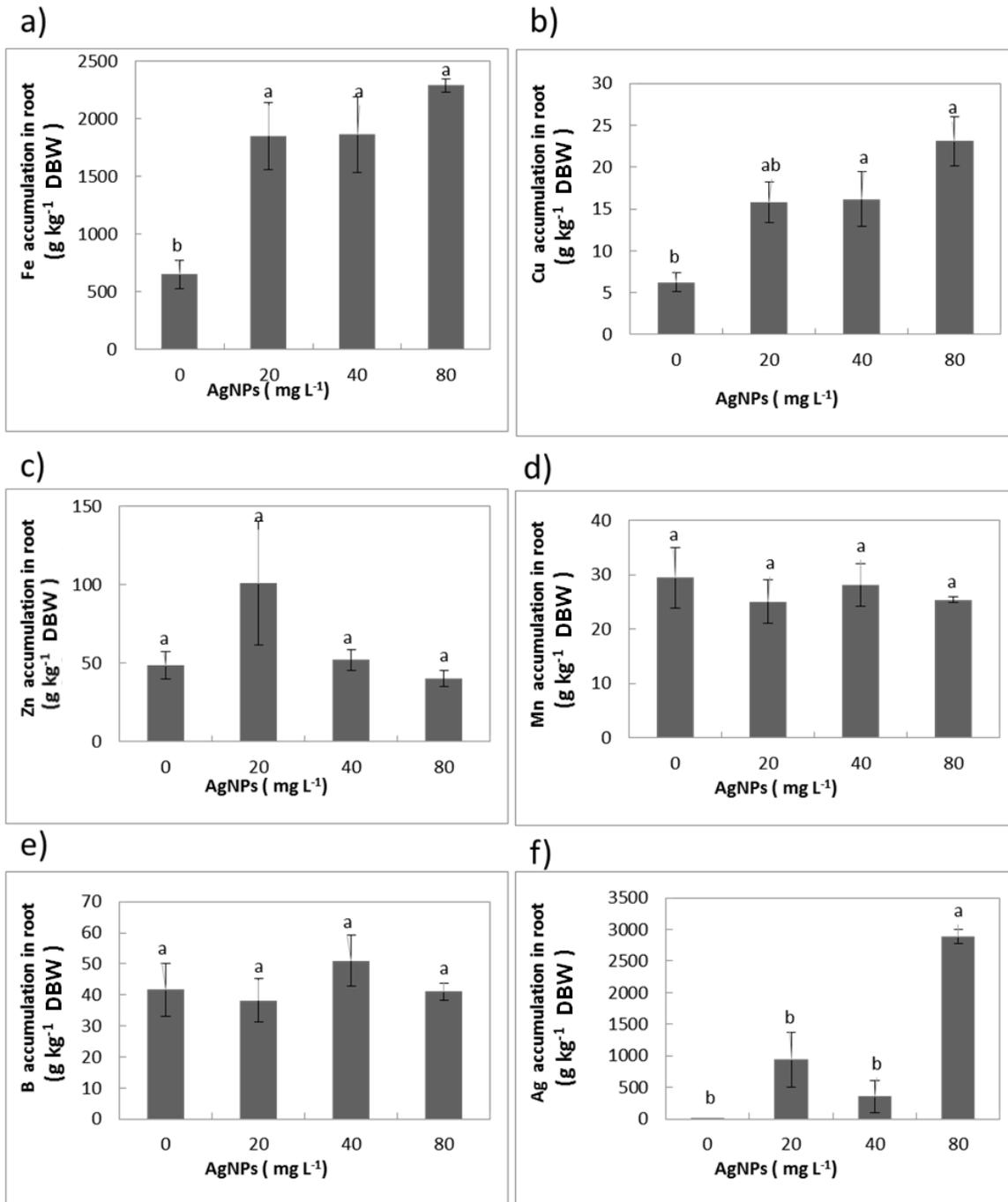


Figura 1.16. Acumulación de micronutrientos y Ag en raíz de arroz cv. Morelos A-98, tratados vía raíz por 32 días con nanopartículas de plata (AgNPs) en solución. Medias \pm DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). DBW: Dry Biomass Weight.

1.4.7. Las AgNPs disminuyen las concentraciones de clorofilas

La concentración de clorofila *a* en vástago se redujo significativamente en 23.65% con la aplicación de 20 mg L⁻¹ AgNPs, en 38.79% con 40 mg L⁻¹ AgNPs y en 43.38% con 80 mgL⁻¹ AgNPs, en comparación con el control (**Figura 1.17a**). De la misma manera, las AgNPs redujeron la concentración de clorofila *b* en aproximadamente 28% en plantas tratadas con 20 mg L⁻¹ AgNPs, en más de 27% en las expuestas a 40 mg L⁻¹ AgNPs, y en 30% en las expuestas a 80 mg L⁻¹ AgNPs, respecto al control (**Figura 1.17b**). La concentración de clorofila total se redujo en 24.44 % con 20 mg L⁻¹ AgNPs, 36.62% con la aplicación de 40 mg L⁻¹ AgNPs, y en 40% con la aplicación de 80 mg L⁻¹ AgNPs, respecto al control (**Figura 1.17c**).

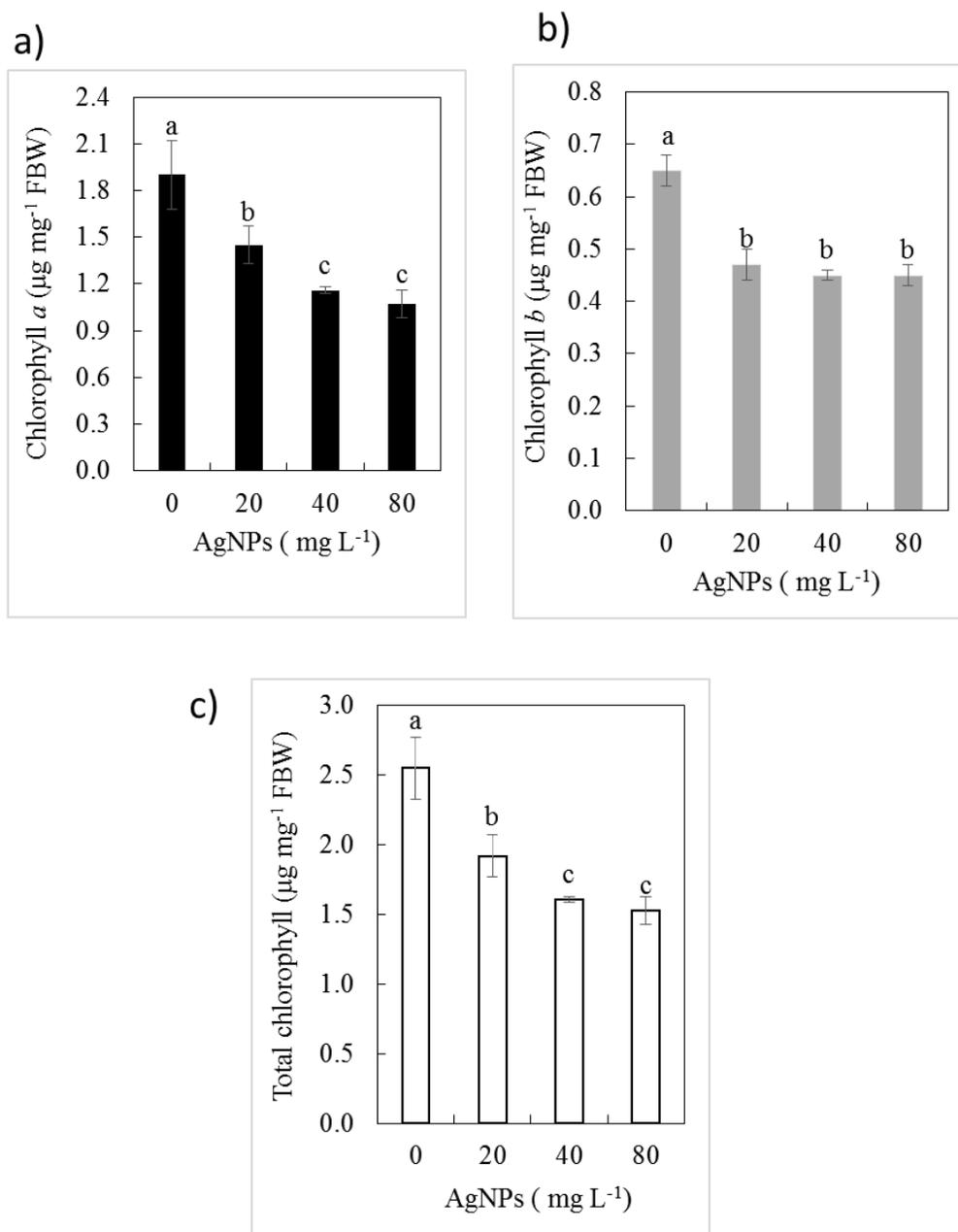


Figura 1.17. Concentración de clorofilas en vástago de arroz por efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de AgNPs a partir de PVP-AgNPs. Concentración de clorofila *a* (a), concentración de clorofila *b* (b) y concentración de clorofila total (c), en vástagos de plantas de arroz cv. Morelos A-98 tratadas con AgNPs. Las plantas fueron crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 32 días. Medias ± DE en cada figura con letra distinta, indican diferencias estadísticas significativas (LSD, 0.05). FBW: Fresh Biomass Weight.

1.4.8. El AgNPs afectan diferencialmente las concentraciones de aminoácidos y azúcares totales en vástago y raíz

La concentración de aminoácidos libres totales en vástagos no fue afectada por los tratamientos probados. Resultó interesante observar que, en raíz, los tratamientos con 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, aumentaron en 10.24% y 11.41% las concentraciones de estas biomoléculas respecto al control, y estas diferencias fueron significativas (**Figura 1.18a**).

La concentración de azúcares totales, en vástago, disminuyó 62.47, 46.48 y 39.63% con la aplicación de 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs respectivamente, con respecto al control. En raíz, se obtuvo una disminución significativa en la concentración de azúcares, de 51.22% con la adición de 20 mg L⁻¹ AgNPs, un 63.65% con 40 mg L⁻¹ y solo 7.15% a 80 mg L⁻¹ AgNPs (**Figura 1.18b**).

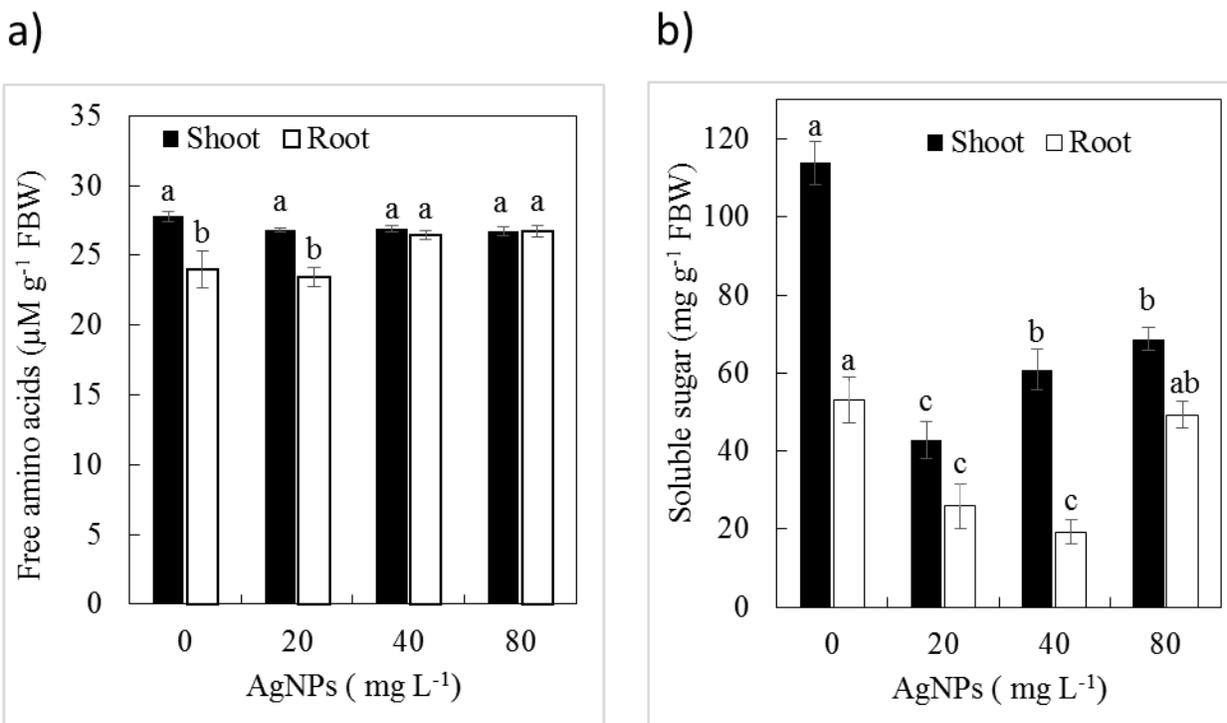


Figura 1.18. Concentración de aminoácidos libres totales (a), azúcares totales (b) en vástago y raíz de plantas de arroz cv. Morelos A-98, crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 32 días. Medias ± DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas entre tratamientos (LSD, 0.05). FBW: Fresh Biomass Weight.

1.4.9. Las AgNPs aumentan las concentraciones de prolina en vástago, pero no en raíz

Los tratamientos con AgNPs generaron aumentos en la concentración de prolina en vástago del orden de 4.51 y 119.05% en plantas tratadas con 20 y 40 mg L⁻¹ AgNPs, respectivamente, y del orden de 270.43% en plantas expuestas a 80 mg L⁻¹ AgNPs, mientras que en raíz las concentraciones se mantuvieron estadísticamente similares (**Figura 1.19a**).

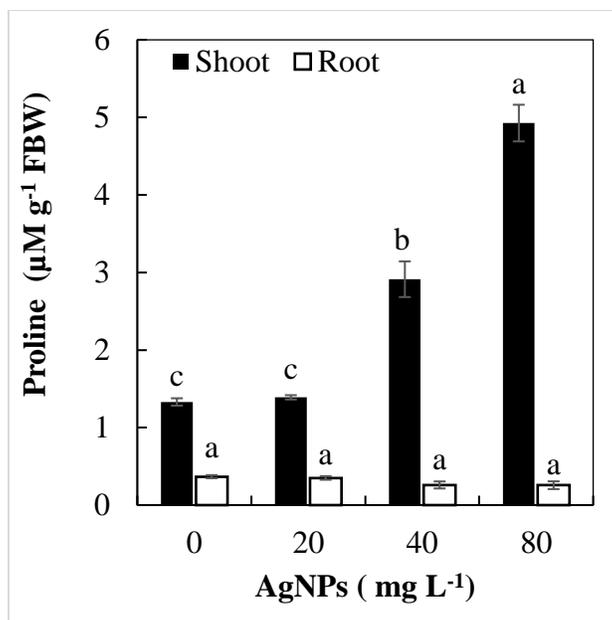


Figura 1.19. Concentración de prolina en vástago de arroz crecidas en solución nutritiva de Yoshida con 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs durante 32 días. Medias ± DE con letras distintas en cada variable, indican diferencias estadísticas entre tratamientos (LSD, 0.05). FBW: Fresh Biomass Weight.

1.5. Discusión

1.5.1. Germinación en arroz

En esta investigación se evaluó el impacto de las AgNPs en la germinación, el crecimiento inicial de plántulas después de la germinación, y el crecimiento vegetativo de plantas en condiciones hidropónicas en invernadero. Uno de los factores importantes que puede determinar el efecto estimulante o fitotóxico de las nanopartículas es su tamaño. De hecho, las AgNPs más pequeñas muestran mayor fitotoxicidad [30]. AgNPs de 25 nm presentan una mayor absorción y con ello un daño celular en arroz [31].

Nuestro estudio revela un efecto inductor de germinación de semillas y crecimiento inicial de plántulas, pues a concentraciones de 80 y 120 mg L⁻¹ AgNPs el porcentaje de germinación (**Figura 1.1**) y el crecimiento relativo de plántulas, tanto de vástagos como de raíces (**Figura 1.2**). Sin embargo, los datos observados en el presente experimento son contrarios a los observados en un estudio en el que se

sumergieron semillas de arroz Jazmín a concentraciones de 10 a 100 mg L⁻¹ de AgNPs durante 24 horas, y que resultaron ser concentraciones tóxicas para la germinación y crecimiento de plántulas de arroz [28].

1.5.2. Producción de biomasa en etapas iniciales de crecimiento de plántulas de arroz

Como se observa en la **Figura 3**, al aplicar 80 mg L⁻¹ AgNPs se produjo mayor crecimiento inicial de vástago y raíz (**Figura 1.3**), lo cual se tradujo en mayores pesos de la materia fresca (**Figura 1.4a**) y seca (**Figura 1.4b**) de estos órganos. Estos resultados posiblemente se deban a que las AgNPs pueden acelerar el metabolismo del almidón almacenado en las semillas de arroz porque inducen la absorción de agua más rápido en el proceso de hidratación. En un experimento similar, la aplicación de 10 y 20 mg L⁻¹ AgNPs a semillas de arroz aumentó significativamente (2.6 y 2.5 veces, respectivamente) la actividad de α -amilasa en comparación con las semillas control, así como el contenido de azúcares solubles totales [26].

Al observar el comportamiento del crecimiento entre tejidos evaluados es posible establecer que las raíces son más sensibles que los vástagos a la aplicación de los tratamientos, tanto en la producción de materia fresca como seca (**Figuras 1.4a y 1.4b**).

Los efectos en la reducción del crecimiento en los tratamientos evaluados pueden estar asociados a la regulación de la producción de compuestos inhibidores o metabolitos secundarios tóxicos más en raíz que en vástago. Para comprobar esta hipótesis, será necesario identificar los metabolitos producidos en estas condiciones experimentales y las hormonas responsables de los efectos inhibitorios observados, como lo es el etileno y su relación con las citocininas [27].

1.5.3. Crecimiento de plantas de arroz en fase vegetativa

Tanto en altura de planta como en longitud de raíz, ninguno de los tratamientos fue estadísticamente superior al control, observándose una disminución de estas variables de crecimiento respecto al control. En plantas de frijol y maíz con la dosis más alta de 100 ppm AgNPs disminuye la longitud de raíz, en las dos especies de estudio [10]. Las AgNPs producen una disminución ligera en la longitud de raíz y tallo, así como la desaparición de cámaras de aire en la corteza de la raíz, alteración de la forma, tamaño y distribución de los elementos del xilema en tallos de *Bacopa monnieri* [32]. En arroz, el tratamiento con 30 μ g mL⁻¹ AgNP, estimuló la ramificación de la raíz y el peso seco, contrario a lo observado en brotes

[9]. En trigo var. UP2338, caupí (*Vigna sinensis* var. PusaKomal), y Brassica (*Brassica juncea* var. Pusa Jai Kisan), el efecto de las nanopartículas varió de una especie de planta a otra; en trigo no se observó un efecto significativo en los parámetros de crecimiento, en caupí a una concentración de 50 ppm AgNPs promovió el crecimiento y una mayor nodulación de la raíz, y en Brassica con 75 ppm AgNPs mejoró la longitud de brote [33]. También se ha observado una reducción significativa en la longitud de raíz (0.99 ± 0.13 cm) en plántulas de arroz cultivadas en presencia de 1 mg L^{-1} AgNPs [14]. En el cv. KDML 105 de arroz, la aplicación de 100 y 1000 mg L^{-1} AgNP inhibió la longitud de raíces [28]. Así también, las longitudes de raíces de seis especies de plantas se redujeron significativamente cuando las semillas se expusieron a AgNP frente a nitrato de plata (AgNO_3) (Yin et al., 2012) [29]. En mostaza (*Brassica* sp.) la aplicación de 3 mM AgNP y AgNO_3 disminuyeron longitud de brote y de raíz [34]. En rábano (*Raphanus sativus*) la aplicación de 500 mg L^{-1} AgNPs redujo longitud de raíz y brotes en un 47.7 y 40% con respecto al control [35]. En plántulas de *Lupinus termis*, la aplicación de 500 ppm AgNPs redujo longitud de raíces y brotes después de 10 días de tratamiento [36]. De hecho, las raíces se consideran la principal vía de exposición a NPs que pueden generar toxicidad física o química en las plantas [37].

En nuestro estudio, la biomasa fresca en raíz y seca en vástago disminuyó con la aplicación de AgNPs. En plantas de rábano expuestas a 250 mg L^{-1} AgNPs disminuyó la biomasa seca comparada con el control [35]. En mostaza expuesta a 3 mM AgNO_3 y AgNP se observó disminución de biomasa fresca de brote y raíz [34]. En arroz cv. KDML 105 expuesto a 1000 mg L^{-1} AgNPs se reportaron decrementos significativos de biomasa fresca y seca en brotes y raíces [28]. En plántulas de arroz aplicaciones de 1.0 mg L^{-1} AgNPs redujeron peso fresco de brotes y raíces [14]. En *Lupinus termis* la aplicación de 500 ppm AgNPs disminuyó el peso fresco en brotes y raíces [36]. Sin embargo, en caupí (*Vigna sinensis*), aplicaciones de 50 ppm AgNPs incrementaron la biomasa fresca y seca en brotes y raíces.

1.5.4. Indicadores fotosintéticos en arroz

En nuestro estudio bajas concentraciones de AgNPs favorecieron indicadores fotosintéticos en arroz (**Figura 1.8 a, b, c y d**). Sin embargo, en rosa (*Rosa hybrida* cv. Movie Star) con aplicaciones de 50 y 100 mg L^{-1} de nanopartículas de plata la conductancia estomática y la tasa de transpiración fueron menores al control durante el período de evaluación [38], lo cual puede deberse a las diferentes condiciones experimentales y las diferentes dosis probadas. En *Cucurbita pepo* la aplicación de 100 a 1000 mg L^{-1} AgNPs de 100 nm reduce en un 41 a 79% la tasa de transpiración [39].

1.5.5. Concentraciones y acumulaciones de nutrimentos en vástago

En nuestro estudio la concentración de los tres macronutrimentos primarios (N, P y K) en vástagos de arroz no fueron afectados por las AgNPs (**Figuras 1.9a, b y c**). Contrario a nuestros resultados, en caña de azúcar se han reportado incrementos en las concentraciones de N y Mg con aplicaciones de 100 y 200 mg L⁻¹ AgNPs [11], mientras que P, K y Ca no mostraron ninguna diferencia entre tratamientos. los nutrimentos N y Mg participan en la biosíntesis de la clorofila, molécula esencial en la fotosíntesis, misma que en nuestro estudio disminuyó al aplicar AgNPs. Por otra parte, en trigo var. NARC-2009 la aplicación de 25 ppm AgNPs incrementó el uso eficiente de N, P y K, aunque conforme aumentó la dosis a 150 ppm AgNPs las concentraciones de estos macronutrimentos disminuía [12]. Para Ca y Mg se ha reportado una relación inversa, ya que conforme se incrementan las concentraciones de AgNPs de 125-500 mg L⁻¹, las concentraciones de estos dos últimos macronutrimentos disminuyen [35].

En relación con los micronutrimentos en vástagos de arroz, la concentración de Fe fue superior con 20 mg L⁻¹ con respecto al control y al resto de los tratamientos (**Figura 1.11a**). Incrementa este micronutriente con aplicaciones de 50, 100 y 200 mg L⁻¹ AgNPs, mientras que las concentraciones de Cu y Zn disminuyen con esas dosis [11]. Con incrementos de 125-500 mg L⁻¹ AgNPs disminuye la concentración de B, Mn, Cu, mientras que a 125 mg L⁻¹ incrementa la concentración de Zn [35].

Las raíces se han considerado como la ruta principal de exposición de las plantas a las nanopartículas de plata [37].

1.5.6. Concentración de clorofilas

En este estudio, se observó una disminución significativa en el contenido de clorofila *a*, *b* y clorofila total, que podría deberse al descenso de la cantidad de la biomasa tanto fresca y seca o como respuesta al daño de las membranas de cloroplastos debido un aumento de ROS generando un estrés oxidativo afectando negativamente el potencial de las plantas [40]. Tratamientos de AgNO₃ y AgNP a concentraciones de 1 y 3 mM disminuyeron la concentración total de clorofila y carotenoides en (*Brassica* sp.) [34]. En plántulas de arroz, un descenso en la concentración de clorofila total y carotenoides al incrementar la dosis a 1.0 mg L⁻¹ AgNPs [14]. En arroz la aplicación de 60 mg L⁻¹ AgNPs favoreció la concentración de clorofila *a* y carotenoides, mientras que la clorofila *b* disminuye a esa concentración [9]. Plantas de frijol mungo (*Vigna radiata* L.) expuestas a 5, 10 y 20 mg L⁻¹ AgNPs no mostraron cambios significativos comparados con el control, aunque el contenido de clorofila total disminuyó significativamente con la aplicación de 50 mg L⁻¹ AgNPs [14]. En tomate, aplicación de 80 mg L⁻¹ AgNPs decrementó significativamente concentraciones de clorofila total con respecto al control [41]. En frijol y maíz la concentración de clorofilas *a*, *b*, total y carotenoides aumenta, con aplicaciones de 20-60 ppm AgNPs [10]. Incremento en la concentración de clorofila con aplicaciones de 25, 50 y 100 ppm AgNPs en plántulas de mostaza var. Pusajaikisan, debido a que las AgNPs mejoran la eficiencia del intercambio celular de electrones, evitando la fuga de electrones y reduciendo la formación de especies reactivas de oxígeno [7].

1.5.7. Concentración de aminoácidos y azúcares solubles

La reducción significativa que muestra la concentración de azúcares solubles tanto en vástago como en raíz podría estar relacionado con la biomasa total y ésta a su vez con la actividad fotosintética, dando como resultado una disminución en pigmentos fotosintéticos en presencia de AgNPs. En plántulas de arroz con aplicaciones de 1.0 mg L⁻¹ AgNPs disminuye la concentración de azúcares totales y azúcares reductores siendo más evidentes estos últimos [14]. En raíces de arroz el contenido de carbohidratos solubles totales disminuyó significativamente en respuesta a 60 mg L⁻¹ AgNPs [9]. En maíz y frijol con aplicaciones de 80-100 ppm AgNPs disminuyen los carbohidratos, mientras con aplicaciones de 60 ppm favoreció la concentración de carbohidratos en maíz, y el contenido de proteínas incrementó con esa misma concentración de AgNPs en frijol [10]. Contenidos más altos de carbohidratos y proteínas en respuesta a aplicaciones de 60 ppm AgNPs en variedades de chícharo [42]. Con aplicaciones de 75 y 100

mg L⁻¹ AgNPs se observaron los mayores aumentos de aminoácidos en plantas de tomate. La aplicación de 50, 75 y 100 mg L⁻¹ AgNPs causó una disminución significativa en el contenido total de proteínas solubles [13]. En trigo la aplicación de AgNP redujo los contenidos de arginina e histidina 13.0 y 11.8%, respectivamente en comparación con el control [43].

1.5.8. Concentración de prolina

El aumento significativo en la concentración de prolina, en esta investigación, podrían ser el resultado del mecanismo de protección de estructuras celulares y biomoléculas que presentan las plantas en presencia de ROS [44]. Tanto en arroz como en frijol mungo la aplicación de 20 y 50 mg L⁻¹ AgNPs aumentó el contenido total de prolina en comparación con el control [14]. Sin embargo, en mostaza el contenido de prolina disminuye conforme incrementa la concentración de nanopartículas de plata [7].

1.6. Conclusiones

El uso de AgNPs en concentraciones de 40, 80 y 120 mg L⁻¹ induce la germinación, en tanto que la aplicación de 80 y 120 mg L⁻¹ de AgNPs promueven el crecimiento inicial siendo 80 mg L⁻¹ AgNPs la concentración idónea para el cultivar Morelos A-98. De estos datos se puede concluir que la aplicación de AgNPs a dosis de 40 a 120 mg L⁻¹ puede inducir la germinación y el crecimiento inicial de plántulas, con lo que se pueden reducir los costos o el tiempo de producción en el establecimiento de almácigo.

Durante el desarrollo vegetativo de las plantas de arroz, la aplicación de AgNPs disminuyó las diferentes variables de crecimiento medidas, aunque aumentó indicadores fotosintéticos, algunos nutrimentos esenciales y prolina.

1.7. Referencias citadas

1. Fernández D S R, Ramírez P, Silva J, Storaci V, Cuamo L, De Guglielmo Z, Smits, G. Establishment of an *in vitro* Selection of Venezuelan Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.) Resistant to the Fungus *Pyricularia grisea*. *Acta Biol.Colomb.* 2017; 22(1): 85-100. doi: 10.15446/abc.v22n1.56933
2. USDA, “2016 Grain and Feed Annual Mexico,” GAIN report MX6009, March 12, 2016.
3. Hernández AL, Tavitas-FL, Alberto CP. Paquetes Tecnológicos para el cultivo de arroz en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos, México. Folleto Técnico, 2015; No. 87. 85p.
4. Yang Y, Li M, Michels C, Moreira-Soares H, Alvarez PJJ. Differential sensitivity of nitrifying bacteria to silver nanoparticles in activated sludge. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014; 33(10) 2234–2239. doi: 10.1002/etc.2678
5. Zheng Y, Hou L, Liu M, Newell SE, Yin G, Yu C, Liu C. (2017). Effects of silver nanoparticles on nitrification and associated nitrous oxide production in aquatic environments. *Sci. Adv.* 2017; 3(8): e1603229. <http://doi.org/10.1126/sciadv.1603229>
6. Malynych S, Luzinov I, Chumanov G. Poly (vinyl pyridine) as a universal surface modifier for immobilization of nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 2002; B 106 (6): 1280–1285. doi: 10.1021/jp013236d
7. Sharma P, Bhatt D, Zaidi M, Saradhi P, Khanna P, Arora S. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *ApplBiochem.Biotechnol.* 2012; 167(8): 2225-2233. doi: 10.1007/s12010-012-9759-8
8. Dimkpa CO, McLean JE, Britt DW, Anderson AJ. Nano-CuO and interaction with nano-ZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotoxicol.* 2015; 24(1):119–129. doi: 10.1007/s10646-014-1364-x

9. Mirzajani F, Askari H, Hamzalou S, Farzaneh M, Ghassempour A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicol. Environ.Saf.* 2013; 88:48-54. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.018
10. Salama HMH. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Int. Res. J. Biotech.* 2012; 3(10): 190-197.
11. Bello-Bello J, Chaves-Santoscoy RA, Lecona-Guzmán CA, Bogdanchicova N, Salinas-Ruíz J, Gómez-Merino FC, Pestryakov A. Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose-Response* 2017; 1-9. doi: 10.1177/1559325817744945
12. Jhanzab HM, Razzaq A, Jilani G, Rehman A, Hafeez A, Yasmeen F. Silver nano-particles enhance the growth, yield and nutrient use efficiency of wheat. *Int. J. Agron. Agri. Res.* 2015; 7(1): 15-22.
13. Karami MS, Heidari R, Rahmani F. Effect of silver nanoparticles on free amino acids content and antioxidant defense system of tomato plants. *Ind. J. Plant Physiol.* 2015; 20(3): 257-263. doi: 10.1007/s40502-015-0171-6
14. Nair PMG, Chung IM. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedling. *Chemosphere.* 2014; 112:105-113. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.056
15. Bello-Bello, J, Chavez-Santoscoy, R, Lecona-Guzmán, C, Bogdanchikova, N, Salinas-Ruíz, J, Gómez-Merino, F, Pestryakov, A. 2017. Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose-Response*, 15(4), 155932581774494. doi: 10.1177/1559325817744945
16. Famoso AN, Clark RT, Shaff JE, Craft E, McCouch SR, Kochian LV. Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiol.* 2010; 153(4), 1678-1691. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.110.156794>
17. Moreno-Alvarado M, García-Morales S, Trejo-Téllez LI, Hidalgo-Contreras V, Gómez-Merino FC. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of *NAC* transcription factors in rice. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 1–16. doi: 10.3389/fpls.2017.0003

18. Rasband WS. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2017;<http://imagej.nih.gov/ij/>
19. Reynolds, MP, Pask, AJD and Mullan DM. *Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation*. Mexico, D.F.: CIMMYT. 2012; Eds.
20. Alcántar, GG, and Sandoval, VM. *Handbook of Chemical Analysis of Tissue Vegetable*. Chapingo: Mexican Society of Soil Science A.C. 1999.
21. Bremner JM. Total nitrogen. *Agronomy*. 1965; 9: 1149–1178
22. Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, and Stitt M. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ*. 1998; 21: 253–268. doi:10.1046/j.1365-3040.1998.00277.x
23. Moore S Stein WH. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem*. 1954; 211: 907–913
24. Bailey RW. The reaction of pentoses with anthrone. *Biochem. J*. 1958; 68: 669-672. doi: 10.1042/bj0680669
25. SAS. 2011. Institute. *Statistical Analysis System version 9.3. User's Guide*. Cary, NC.
26. Mahakham W, Sarmah AK, Maensiri S, Theerakulpisut P. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Sci. Rep*. 2017; 7: 8263. doi: 10.1038/s41598-017-08669-5
27. Han Y, Wang Y, Wang C, Xu J, Zheng D. *UvHOG1* is important for hyphal growth and stress responses in the rice false smut fungus *Ustilaginoideavirens*. *Sci. Rep*. 2016; 6: 24824. doi: 10.1038/srep24824
28. Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S. Effect of silvernanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicol. Environ.Saf*. 2014; 104: 302-309. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.022

29. Yin, L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. PLoS ONE. 2012; 7 (10): e47674. doi: 10.1371/journal.pone.0047674
30. Lee, JG, Wang, Q, Yao, Y, Zhang, W, Geisler, M, Li, K, Huang, Y, Chen, Y, Kolmakov, A, Ma, X. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. Nanotoxicology. 2013; 7: 323–337.
31. Mazumdar, H, Ahmed, GU. Phytotoxicity effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. Int. J. ChemTech Res. 2011; 3: 1494–1500.
32. Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kaleichelvan PT. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. Process. Biochem. 2012; 47 (4):651-658. doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.006
33. Pallavi Mehta CM, Srivastava R, Arora S, Sharma AK. Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. 3 Biotech. 2016; 6:254. doi: 10.1007/s13205-016-0567-7
34. Vishwakarma K, Shweta, Upadhyay N, Singh J, Liu S, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Tripathi DK, Sharma S. Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica* sp. Front. Plant Sci. 2017; 8:1501. doi: 10.3389/fpls.2017.01501
35. Zuverza-Mena N, Armendariz R, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. Front. Plant Sci. 2016; 7: 90 doi: 10.3389/fpls.2016.00090
36. Al-Huqail A, Hatata MM, AL-Huqail AA, Ibrahim MM. Preparation, characterization of silver phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings. Saudi. J. Biol. Sci. 2018; 25 (2): 313-319. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.08.013
37. Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I. Silver nanoparticles in soil-plant systems. J. Nanopart. Res. 2013; 15: 1896. doi:10.1007/s11051-013-1896-7
38. Lu P, Cao J, He S, Liu J, Li H, Cheng G, Ding Y, Joyce DC. Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose cv. Movie Star flowers. Postharvest Biol. Technol. 2010; 57:196-202. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.04.003
39. Stampoulis D, Sinha SK, White JC, Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 2009;43 9473–9479. 10.1021/es901695c

40. Ma, C, Chhikara, S, Xing, B, Musante, C, White, JC, Dhankher, OP. Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* (L.) to nanoparticle cerium and indium oxide exposure. ACS Sustain. Chem. Eng. 2013; 1: 768–778.
41. Çekiç FO, Ekinçi S, Inal MS, Ünal D. Silver nanoparticles induced genotoxicity and oxidative stress in tomato plants. Turk. J. Biol. 2017; 41: 700-707. doi:10.3906/biy-1608-36
42. Mehmood A, Murtaza G. Impact of biosynthesized silver nanoparticles on protein and carbohydrate contents in seeds of *Pisum sativum* L. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 2017; 14(4): 334-340. doi: 10.1590/1984-70332017v17n4a51
43. Yang J, Jiang F, Ma C, Rui Y, Rui M, Adeel M, Cao W, Xing B. Alteration of crop yield and quality of wheat upon exposure to silver nanoparticles in a life cycle study. J. Agric. Food Chem. 2018; 66 (11): 2589-2597. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04904
44. Hayat, S, Hayat, Q, Alyemeni, M, Wani, A, Pichtel, J, & Ahmad, A. Role of proline under changing environments. Plant Signaling & Behavior, 2012; 7(11), 1456-1466. doi: 10.4161/psb.21949

CAPÍTULO II. LA EXPOSICIÓN DE PLANTAS DE ARROZ A NANOPARTÍCULAS DE PLATA AFECTA LA EXPRESIÓN DE GENES MULTIFUNCIONALES NAC

2.1. Resumen

El arroz (*Oryza sativa*) es una especie capaz de tolerar diferentes tipos de estrés a través de diversos mecanismos, incluyendo la regulación de la expresión génica. Los factores de transcripción *NAC* constituyen una familia que se encuentra exclusivamente en plantas y que responden a estímulos ambientales como calor, frío, salinidad, sequía y metales. Su multifuncionalidad puede ser útil para explicar las respuestas fisiológicas y bioquímicas observadas entre genotipos, aunque el efecto de las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre la expresión de estos genes no ha sido explorado. En esta investigación se estudió el efecto de las AgNPs en la expresión de 17 genes *NAC* en plantas de arroz expuestas a 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs en condiciones de hidroponía en invernadero. De las plantas tratadas y control se extrajo RNA total de vástago, a partir del cual se sintetizó cDNA y se realizó una medición de la expresión génica por la técnica de qRT-PCR. Como gen de referencia se tomó el *Factor de elongación 1a*, que mostró mayor estabilidad. La expresión relativa de los genes se determinó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, con un valor de expresión diferencial de 2. Se encontró que las AgNPs indujeron la expresión de cuatro genes *NAC* (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g43530* y *Os06g5107*) por al menos una dosis de AgNPs probada, y un gen (*Os08g10080*) mostró represión de la expresión por la presencia de estas nanopartículas en la solución nutritiva. En el gen *Os07g04560*, la expresión fue dependiente de la concentración de AgNPs, esto es, a mayor concentración de AgNPs en el medio, mayor expresión del gen. Se concluye que las nanopartículas de plata afectan diferencialmente la expresión de genes *NAC* en arroz, lo que corrobora la multifuncionalidad de estos genes en plantas.

Palabras clave: Poaceae, *Oryza sativa*, nanopartículas, plata, expresión génica, qRT-PCR, factores de transcripción, genes *NAC*.

2.2. Introducción

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen propiedades ópticas, eléctricas y térmicas únicas que les permiten diversos usos, incluyendo su empleo como agentes antimicrobiales, especialmente contra bacterias (Li *et al.*, 2010; Lubick, 2008). Actualmente, las nanopartículas de plata tienen el mayor grado de comercialización entre los nanomateriales producidos en el mundo y en la agricultura han abierto una ventana de oportunidades en la estimulación del crecimiento y la protección vegetal (Ávalos *et al.*, 2013). De acuerdo con Pallavi *et al.* (2016), las aplicaciones de AgNP a concentraciones de 50 ppm en frijol caupí (*Vigna sinensis*) y de 75 ppm en mostaza castaña (*Brassica juncea*) estimularon algunas variables de crecimiento. En frijol común (*Phaseolus vulgaris*), Das *et al.* (2018) reportaron que la aplicación de 25 a 50 mg kg⁻¹ de AgNPs sintetizadas en plantas aumentó el índice de área foliar, número de hojas, contenido de clorofilas, la actividad nitrato reductasa y el rendimiento. En tabaco (*Nicotiana tabacum*), las AgNPs promovieron el enraizamiento de explantes en condiciones *in vitro* (Thangavelu *et al.*, 2018). Sin embargo, la aplicación de AgNPs también puede tener efectos adversos en algunas especies. Por ejemplo, plantas de cebolla (*Allium cepa*) expuestas a 0.001 mg L⁻¹ AgNPs mostraron inhibición del crecimiento de raíces (Pittol *et al.*, 2017). De acuerdo con Cox *et al.* (2016), las AgNPs afectan procesos como germinación, crecimiento y actividad fotosintética de varias maneras, incluyendo estrés oxidativo, citotoxicidad y genotoxicidad, y la magnitud del efecto depende de factores como el tamaño de la nanopartícula, la forma, el revestimiento, el uso de acarreadores, el genotipo de planta y las condiciones experimentales. En caña de azúcar (*Saccharum* spp.), Bello-Bello *et al.* (2017) reportaron que la aplicación de AgNPs ocasionó incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno y de peroxidación lipídica en todas las concentraciones probadas (0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ AgNPs), aunque a bajas concentraciones (i.e. 25 a 50 mg L⁻¹ AgNPs) se estimuló el crecimiento y la concentración de nitrógeno en tejido vegetal.

El efecto de la aplicación de AgNPs se ha estudiado principalmente a nivel fisiológico, bioquímico y celular, pero poco se ha explorado su efecto a nivel molecular en la inducción o represión de factores de transcripción que se relacionan con el control del crecimiento y las respuestas a estrés, como son los genes de la familia NAC.

Los genes NAC, cuyo nombre deriva de las iniciales de los nombres de los tres primeros genes descubiertos de esta familia: no apical meristem (NAM), Arabidopsis transcription activation factor

(ATAF), y cup-shaped cotyledon (CUC) constituyen una familia de factores de transcripción única en plantas (Pei *et al.*, 2013). Estos genes son considerados multifuncionales, pues pueden participar en el control de procesos tan diversos como el crecimiento y desarrollo, y las respuestas a factores de estrés biótico y abiótico (Shao *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue analizar si la aplicación de niveles crecientes de AgNPs a plantas de arroz en condiciones de hidroponía en invernadero, tienen algún efecto en el control de la expresión de genes *NAC* en vástago.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Material vegetal

Para esta investigación se utilizaron semillas de arroz cv. Morelos A-98 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) que se obtuvieron del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el Campo Experimental Zacatepec, estado de Morelos, en México, el cual se encuentra ubicado a 18°39' NL, 99°12' WL, a 910 m de altitud.

2.3.2. Desinfección y siembra de semillas

Las semillas fueron desinfectadas con una solución de etanol al 70% por 10 min, inmediatamente después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sumergieron por 1 h en hipoclorito de sodio al 5% al cual se le adicionó previamente una gota de tween 20 (Hycel; Zapopan, Jalisco, México).

Una vez desinfectadas, las semillas se colocaron sobre papel filtro estéril y se dejaron secar. Posteriormente las semillas se depositaron en frascos de vidrio en cuyo interior contenían medio MS (Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemania) suplementado con 3% (w/v) de sacarosa (J.T.Baker; Center Valley, PA, USA) y solidificado con 0.8% de agar (Merck; Darmstadt, Alemania). Posteriormente los frascos se colocaron en oscuridad a 28 °C por 3 d, después fueron expuestos a luz natural por 11 d.

2.3.3. Establecimiento de las plántulas en hidroponía y aplicación de tratamientos

Una vez que las plántulas alcanzaron 14 d de edad se trasladaron a un sistema hidropónico en condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 28 °C/15 °C (día/noche), humedad relativa de 60% con 16 h luz a 159 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 8 h oscuridad.

Se usaron recipientes plásticos de 8 L con solución nutritiva Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976) (1.43 mM NH_4NO_3 , 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1.64 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1.32 mM K_2SO_4 , 320 μM NaH_2PO_4 , 100 μM Fe-EDTA, 7.99 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.08 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ y 1.39 μM H_3BO_3). Catorce días después del trasplante se aplicaron los siguientes tratamientos a través de la solución nutritiva: 0, 20, 40 y 80 mg L^{-1} AgNPs.

La solución nutritiva fue renovada cada ocho d. El pH de la solución se ajustó a 5.5 utilizando H_2SO_4 o NaOH 1 N. A los 32 d después de haber iniciado los tratamientos (plantas de 46 d de edad) las plantas fueron cosechadas, enjuagadas con agua destilada esteril y divididas en vástago y raíz. Las muestras de vástagos fueron puestas en papel aluminio previamente etiquetado y sumergidas inmediatamente en N líquido y almacenadas en ultracomgelador a -80 °C, para su posterior procesamiento.

2.3.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las muestras de vástago congeladas a -80 °C, debidamente identificadas y contenidas en papel aluminio en fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente, se hizo la extracción de RNA utilizando Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), siguiendo el protocolo de la casa comercial. En el proceso se adicionó DNasa (Promega; Madison, WI, USA), a fin de digerir posibles restos de DNA genómico que pudieran interferir en la reacción de qTR-PCR posterior.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de RNA total utilizando un nanoespectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific; Wilmington, DE, USA), se corrió un gel de agarosa al 1% en un equipo Mini-Sub Cell GT Systems (Bio-Rad; Hercules, CA, USA), y se visualizó la cantidad y calidad de las moléculas en un fotodocumentador (ChemiDoc XRS+ Imaging System, Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Se hizo un comparativo de la relación entre las absorbancias 260/280 y 260/230, así como la definición de bandas de electroforesis en gel.

Una vez comprobada la calidad y cantidad de RNA total, este se diluyó a 625 ng μ L, y se procedió con la síntesis de 5000 ng de cDNA, en un volumen final de reacción de 20 μ L, usando el kit SuperScript®III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

2.3.5. Selección de genes *NAC*, genes de referencia e iniciadores usados

Las secuencias de los iniciadores de los genes *NAC* así como los genes de referencia (**Cuadro 1**), fueron seleccionados con base en [Caldana *et al.* \(2007\)](#), [Riaño-Pachón *et al.* \(2007\)](#) y [Pérez-Rodríguez *et al.* \(2009\)](#). Del total de 57 genes *NAC* depositados en la base de datos Plant Transcription Factors DabaBase (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>), para este estudio se seleccionaron 17 genes *NAC* que mostraron la mayor reproducibilidad en estudios previos bajo nuestras condiciones experimentales.

Cuadro 2.1. Lista de iniciadores específicos usados para el análisis qRT-PCR de factores de transcripción NAC de arroz en respuesta a tratamientos de AgNPs.

TIGR v5.0	Nombre del gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Os02g56600	<i>NAM protein, putative</i>	TACCAGATGTGGCGAAGCTG	TACTTGCGGTTCGCGGAA
Missing annotation	<i>NAM protein, putative</i>	GGAAGAGAAATCCTTCCTGCCT	TGCTCTGGTTGCACGGTTT
Os01g66490	<i>NAM protein, putative</i>	GCCGGCAGCCACAACCTATAG	TTGGTTGATGCGACGACG
Os01g15640	<i>NAM protein, putative</i>	TGCAAAGTGCGATGTTCCAA	ATGGCTCGATCCTTTCCAGTG
Os07g04560	<i>Hypothetical protein</i>	GCAACGTGAACGGTGGCTAC	GCTGCTACTGTTCCATTGCTCC
Os09g32040	<i>Similar to NAM-like protein 7</i>	CGGAAAATCAGATGTTGCGG	GCGCACGTATTCTCTGCCAT
Os12g43530	<i>NAM protein, putative</i>	GATTCATCCGACGGATCAAGA	TCACCTTTGGAAGATCCCAGG
Os06g51070	<i>NAM-like protein</i>	CATCCCGACACCATGCAAT	CCTTCCGGTAGACCTTGCAGA
Os09g33490	<i>Similar to NAC</i>	TCGTCGTCGAGCTGTGTCA	CCTCTCTTTGAGAGGCAGATGG
Os11g31330	<i>NAM protein, putative</i>	AAATACCTCTACCCCGTGCTTT	CAACATCGGTGATGATCGCA
Os04g35660	<i>NAM protein, putative</i>	ATTGAATGGTAAAGCACTCCAATCC	GTCTGCGTCGCATGACTGAA
Missing annotation	<i>NAM protein, putative</i>	GGTCGAGATCGGCCTCAAATA	ACACAGAACAAGCTCGTCGGAG
Os03g59730	<i>NAM protein, putative</i>	GTATCGCATCCCGCAGTTTC	TGTAAGCAGGCGGTTTGAATC
Os07g13920	<i>NAM protein, putative</i>	CGATCAGAACCAACAGGATTGG	AGTCATCGCCCATCACACAGA
Os10g21560	<i>Putative transcription factor</i>	GGAATGACCATAACGCAGCTG	CAAACCCTTGTTTCAGGTGGACT
Os04g40130	<i>Salt-inducible protein</i>	TTACACGGACGAAACGGACCT	AGTGTGATCCCCATCCACCC
Os08g10080	<i>NAC domain protein NAC1</i>	CCTCTCCACCTCAAGGTGAAGACA	CGCAATCCGAACGAAGAACAACAA
Os03g50890	<i>Actin</i>	CTCCCCCATGCTATCCTTCG	TGAATGAGTAACCACGCTCCG
Os05g36290	<i>Actin 1</i>	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA	ATCCAACCGGAGGATAGCATG
Os03g08020	<i>EF1α</i>	GTCATTGGCCACGTCGACTC	TGTTTCATCTCAGCGGCTTCC
Os01g59150	<i>β-Tubulin</i>	GGAGTCACATGCTGCCTAAGGTT	TCACTGCCAGCTTACGGAGG

Los genes de referencia usados fueron *Actina* (*Os03g50890*), *Actina 1* (*Os05g36290*), *Factor de elongación 1 α* (*Os03g08020*) y *β -tubulina* (*Os01g59150*).

La mezcla de PCR contenía 2 μ L de cDNA a una concentración de 10 ng μ L⁻¹, 7.5 μ L de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA), y 1.9 μ L de cada iniciador de los genes a 2 μ M, en un volumen final de 15 μ L. También se llevaron a cabo reacciones de PCR para cada gen de referencia. Cada reacción se realizó por triplicado.

La reacción de RT-PCR en tiempo real o qRT-PCR se realizó con base a [Caldana et al. \(2007\)](#), [García-Morales et al. \(2014\)](#) y [Moreno-Alvarado et al. \(2017\)](#), en un detector de secuencia ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Los valores de estabilidad de expresión (*M*) de los genes de referencia se calcularon de acuerdo con [Vandesompele et al. \(2002\)](#).

2.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico de los datos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo cuatro tratamientos con seis repeticiones cada uno. El perfil de expresión génica fue analizado de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por [Livak y Schmittgen \(2001\)](#) y [Schmittgen y Livak \(2008\)](#). Se tomó un valor de 2 para determinar si los genes eran inducidos (+2) o reprimidos (-2) respecto al gen de referencia establecido.

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. Calidad y cantidad del RNA total extraído

El RNA total extraído usando Trizol fue de buena calidad y en cantidad suficiente, como se muestra en el **Cuadro 2.2**.

Cuadro 2.2. Indicadores de cantidad y calidad del RNA total extraído de vástago plantas de arroz expuesto a diferentes concentraciones de AgNPs en condiciones hidropónicas en invernadero.

Tratamiento	Concentración de RNA total (μ g μ L ⁻¹)	Relación 260/280	Relación 260/230
Control	1032.9	2.08	1.94

20 mg L ⁻¹ AgNPs	1257.5	2.03	1.88
40 mg L ⁻¹ AgNPs	2088.0	2.12	2.23
80 mg L ⁻¹ AgNPs	1132.4	2.08	1.85

Las concentraciones de ácidos nucleicos como el RNA calculadas se basan en el valor de absorbancia a 260 nm, el factor utilizado y el cambio óptico de la muestra. Podría aplicarse también una corrección de línea base de punto único (o una corrección de análisis).

La concentración se proporciona en unidades de masa. Los valores de absorbancia a 260 nm, 280 nm y en ocasiones a 230 nm se utilizan para calcular índices de pureza de los ácidos nucleicos medidos. Los índices de pureza son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra, como los disolventes y reactivos residuales que se utilizan normalmente en la purificación de la muestra.

Los cálculos de la concentración de ácidos nucleicos (ng μL^{-1} , $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ o $\mu\text{g mL}^{-1}$) se basan en una variación de la ecuación de la ley de Beer que utiliza el valor de absorbancia de ácidos nucleicos corregido.

El índice de pureza A_{260}/A_{280} asocia la absorbancia corregida a 260 nm en relación con la absorbancia corregida a 280 nm. Un índice de pureza A_{260}/A_{280} de ~ 2.0 es generalmente aceptado como puro en cuanto a RNA (~ 1.8 para DNA). Las soluciones ácidas podrían reducir el valor proporcionado en 0.2-0.3; en las soluciones básicas, ocurre lo contrario.

El índice de pureza A_{260}/A_{230} asocia la absorbancia corregida a 260 nm en relación con la absorbancia corregida a 230 nm. Para el DNA y el RNA, generalmente se acepta como puro un índice A_{260}/A_{230} entre 1.8 y 2.2.

Como se puede corroborar en el **Cuadro 2.2.**, los valores de las relaciones A_{260}/A_{280} fueron iguales o superiores a 2.0, en tanto que las relaciones A_{260}/A_{230} fueron iguales o superiores a 1.8, lo que indica que el RNA es de buena calidad.

Es importante notar que aunque los índices de pureza que arrojan los espectrofotómetros son indicadores importantes de la calidad de la muestra, es necesario corroborar esta información corriendo una

electroforesis en gel de agarosa. En nuestro estudio, el gel de agarosa al 1% (**Figura 2.1.**) corroboró que las muestras de RNA total extraídas a través del método de Trizol en efecto fueron de buena calidad.

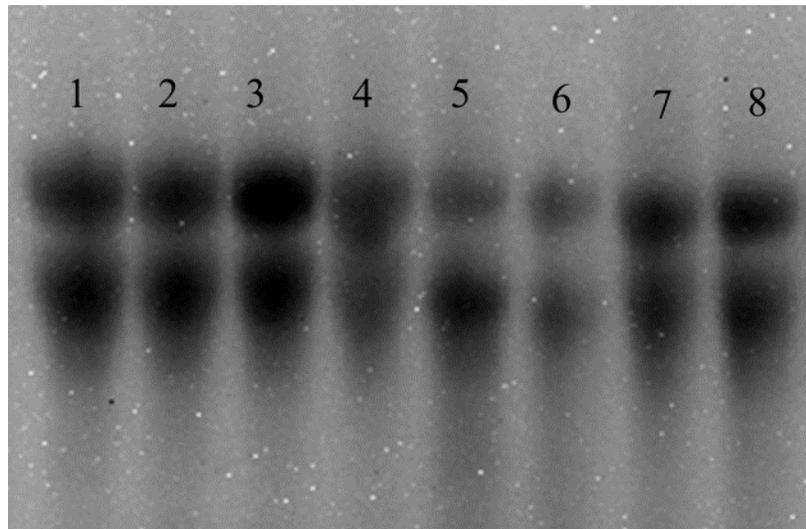


Figura 2.1. Electroforesis en gel al 1% de agarosa que ilustra la corrida de las muestras de RNA total extraídas de vástagos de plantas de arroz expuestas a 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs en condiciones hidropónicas en invernadero. Carriles 1-2: Control; 3-4: 20 mg L⁻¹ AgNPs; 5-6: 40 mg L⁻¹ AgNPs; 7-8: 80 mg L⁻¹ AgNPs.

A pesar de haber podido corroborar la calidad de las moléculas de RNA aisladas en este estudio, el mejor indicador de calidad es la funcionalidad de la aplicación de recuperación y purificación de interés, como lo es una eficiente cuantificación de los RNA mensajeros (actividad génica) a través de qRT-PCR en tiempo real, por ejemplo, como se hizo en este estudio.

2.4.2. Selección de genes de referencia

En este estudio se calculó la estabilidad de la expresión (M) de los genes de referencia con base en [Vandesompele *et al.* \(2002\)](#) (**Cuadro 2.3.**). De acuerdo con esta fuente, entre más bajo es el valor de M , mayor estabilidad representa el gen de referencia para tomarlo como base para estudios de expresión génica.

Cuadro 2.3. Valores de estabilidad de la expresión (M) de los genes de referencia probados para el análisis de qRT-PCR en vástagos de arroz en respuesta a AgNPs, con base en [Vandesompele et al. \(2002\)](#).

Gen	Locus Identifier	Estabilidad de expresión (M)		
		Repetición 1	Repetición 2	Media
<i>Actina</i>	<i>Os03g50890</i>	0.111	0.130	0.121
<i>Actina 1</i>	<i>Os05g6290</i>	0.130	0.145	0.137
<i>Factor de elongación 1α</i>	<i>Os03g08020</i>	0.095	0.107	0.101
<i>β-tubulina</i>	<i>Os01g59150</i>	0.104	0.173	0.139

Del **Cuadro 2** se puede observar que el gen *Factor de elongación 1 α* (*EF1 α* ; *Os03g08020*) es el que presenta el menor valor de M , por lo que fue tomado como gen de referencia para los análisis de expresión génica de los factores de transcripción *NAC* evaluados en este estudio.

2.4.3. Cuantificación de la expresión génica de factores de transcripción *NAC*

La cuantificación de la expresión de genes *NAC* por RT-PCR en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR) se muestra en la **Figura 2.2**. Es posible observar que hubo cuatro genes *NAC* (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os12g435030* y *Os06g5107*) cuya expresión fue estimulada por al menos una dosis de AgNPs probada, y un gen *NAC* (*Os08g10080*) cuya expresión fue reprimida por la presencia de estas nanopartículas en la solución nutritiva.

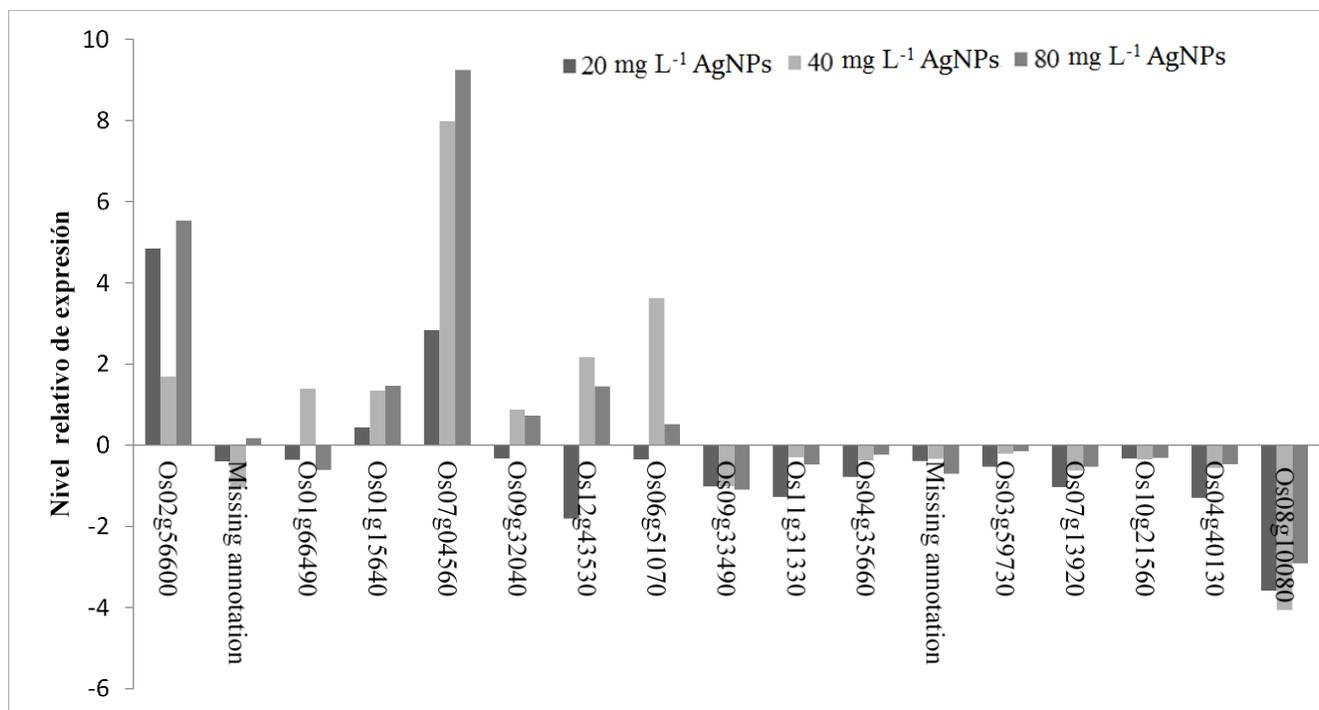


Figura 2.2. Niveles de expresión relativa de genes *NAC* en vástagos de plantas de arroz expuestas a diferentes niveles de nanopartículas de plata (AgNPs) en solución nutritiva en condiciones de hidroponía en invernadero. Los niveles de AgNPs probados en estas condiciones fueron: 0, 20, 40 y 80 mg L⁻¹ AgNPs. El gen de referencia que se tomó como base para hacer los cálculos de expresión génica de los genes *NAC* fue el *Factor de elongación 1α (EF1α; Os03g08020)*, el cual mostró el menor valor de *M*, y por lo tanto, la mayor estabilidad para propósitos de este estudio.

De los cuatro genes *NAC* inducidos por las nanopartículas de plata se observa que el gen *Os02g56600* muestra inducción de la expresión en plantas expuestas a 20 y 80 mg L⁻¹ AgNPs, pero no a 40 mg L⁻¹ AgNPs.

El gen que mostró mayor inducción fue el *Os07g04560*, en los tres niveles de AgNPs probados. Fue importante notar que el nivel de inducción de este gen se incrementó a medida que la concentración de las nanopartículas se aumentaba en la solución nutritiva.

A 40 mg L⁻¹ AgNPs, los genes *Os12g43530* y *Os06g5107* también mostraron inducción en respuesta a la exposición de las plantas a AgNPs, pero no cuando las plantas fueron expuestas a 20 ni a 80 mg L⁻¹ AgNPs. Por el contrario, el gen *Os12g4353* mostró represión de su expresión en plantas tratadas con 20 mg L⁻¹ AgNPs.

En este estudio, el único gen *NAC* que mostró represión en su expresión fue *Os08g10080*, en las tres dosis de AgNPs probadas. En este caso, los niveles de expresión fueron muy similares entre los tratamientos de AgNPs probados.

Un estudio conducido en *Arabidopsis thaliana* identificó 286 genes inducidos y 81 genes reprimidos en respuesta a la aplicación de 5 mg L⁻¹ AgNPs (20 nm) por 10 d. Los genes inducidos estuvieron asociados a toxicidad por metales y estrés oxidativo, en tanto que los reprimidos se asociaron a respuestas a patógenos y a estímulos hormonales (Kaveh *et al.*, 2013). En nuestras condiciones experimentales, coincidentemente hubo una mayor número de genes inducidos que reprimidos.

En otro estudio en *A. thaliana*, Syu *et al.* (2014) reportaron que la exposición a AgNPs indujo la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácido indolacético (indoleacetic acid protein 8; IAA), actividad oxigenasa (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; NCED3), y deshidratación (dehydration-responsive RD22). Demostraron que estas nanopartículas actúan como inhibidores de la percepción de etileno y que pueden interferir en la biosíntesis de esta fitohormona, además de que inducen la acumulación de especies reactivas de oxígeno, promueven el crecimiento de raíces, y activan la expresión de genes involucrado en diferentes procesos celulares como proliferación, metabolismo, y rutas de señalización hormonal.

A la fecha, no encontramos en la literatura estudio alguno que demuestre que algún tipo de factores de transcripción como son los *NAC* responden a AgNPs, por lo que esta investigación es pionera en demostrar que estos genes multifuncionales también pueden intervenir en la regulación de las respuestas de las plantas a la aplicación de nanopartículas de plata. Para conocer más a detalle estas respuestas inducidas por AgNPs en arroz, será necesario realizar mayores análisis a nivel fisiológico, bioquímico y molecular.

2.5. Conclusiones

En este estudio se demostró que los vástagos de plantas de arroz expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) pueden producir moléculas de RNA de buena calidad, que pueden servir de moldes para la síntesis de cDNA. De los genes de referencia probados, el que mostró mayor estabilidad (menor valor de M) fue el *Factor de elongación 1 α* ($EFl\alpha$), cuya proteína promueve la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma durante la biosíntesis de proteínas, en una reacción dependiente de GTP.

De los 17 genes *NAC* probados en este estudio, cinco de ellos mostraron expresión diferencial en plantas tratadas con AgNPs respecto a plantas control. De estos cinco genes expresados diferencialmente en nuestras condiciones experimentales, cuatro de ellos mostraron inducción y uno de ellos mostró represión de su expresión en presencia de AgNPs. Además, dentro de los cuatro genes sobre expresados, uno de ellos también mostró represión de su expresión con la menor dosis de AgNPs probada.

Es importante destacar que este es un estudio pionero que por primera vez demuestra que los genes *NAC* también responden a la presencia de AgNPs. Dada la multifuncionalidad de estos genes en la fisiología vegetal, resultará interesante continuar esta línea de investigación para asociar las respuestas aquí observadas con otras de naturaleza morfológica, bioquímica y fisiológica, que ayuden a tener una mejor estructura de la dinámica de respuestas de las plantas a la presencia de nanopartículas de plata en el medio.

2.6. Referencias citadas

- Ávalos A, Haza AI, Mateo D, Morales P. 2013. Silver nanoparticles: applications and toxic risks to human health and environment. *Rev. Complut. Cien. Vet.* 7: 1-23.
- Bello-Bello JJ, Chávez-Santoscoy RA, Lecona-Guzmán CA, Bogdanchikova N, Salinas-Ruiz J, Gómez-Merino FC, Pestryakov A. 2017. Hormetic response by silver nanoparticles on *in vitro* multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *J. Hazard. Mater.* 364: 62-72. doi. <https://doi.org/10.1177/1559325817744945>
- Caldana C, Scheible WR, Mueller-Roeber B, Ruzicic S. 2007. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Meth.* 3. doi: 10.1186/1746-4811-3-7.
- Cox A, Venkatachalam P, Sahi S, Sharma N. 2016. Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. *Plant Physiol. Biochem.* 107: 147-163. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.022
- Das P, Barua S, Sarkar S, Karak K, Bhattacharyya P, Raza N, Kimf KH, Bhattacharyaa SS. 2018. Plant extract-mediated green silver nanoparticles: Efficacy as soil conditioner and plant growth promoter. *Journal of Hazardous Materials.* 346: 62-72. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.12.020
- Famoso AN, Clark RT, Shaff JE, Craft E, McCouch SR, Kochian LV. 2010. Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiol.* 153: 1678-1691. doi:10.1104/pp.110.156794
- García-Morales S, Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI. 2014. NAC transcription factor expression, amino acid concentration and growth of elite rice cultivars upon salt stress. *Acta Physiol. Plant.* 36: 1927-1936. doi: 10.1007/s11738-014-1569-x

- Haixia Pei H, Nan Ma N, Ji Tian J, Jing Luo J, Jiwei Chen J, Jing Li J, Yi Zheng J, Xiang Chen X, Zhangjun Fei X, Gao J. 2013. An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiol.* 163: 775-791. doi: 10.1104/pp.113.223388
- Kaveh R, Li YS, Ranjbar S, Tehrani R, Brueck CL, Van Aken B. 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.* 47: 10637-1044. doi: 10.1021/es402209w.
- Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, Ou-Yang YS, Chen YB. 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 115-122. doi: 10.1007/s00253-009-2159-5
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 25: 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lubick, N. 2008. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles-or both? *Environ. Sci. Technol.* 42: 8617-8617. doi: 10.1021/es8026314
- Moreno-Alvarado M, García-Morales S, Trejo-Téllez LI, Hidalgo-Contreras JV, Gómez-Merino FC. 2017. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. *Front. Plant Sci.* 8:73. doi: 10.3389/fpls.2017.00073
- Pallavi, Mehta CM, Srivastava R, Arora S, Sharma AK. 2016. Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. *Biotech* 6: 254. doi:10.1007/s13205-016-0567-7
- Pérez-Rodríguez P, Riaño-Pachón DM, Guedes-Correa LG, Rensing SA, Kersten B, Mueller-Roeber B. 2009. PlnTFDB: Updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucl. Acids Res.* 38: D822-D827. doi: 10.1093/nar/gkp805

- Pittol M, Tomacheski D, Simões DN, Ribeiro VF, Santana RMC. 2017. Macroscopic effects of silver nanoparticles and titanium dioxide on edible plant growth. *Environ. Nanotech. Monit. Manag.* 8: 127-133.
- Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B. 2007. PlnTFDB: An integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics* 8: 42. doi.org/10.1186/1471-2105-8-42.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3: 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- Shao H, Wang H, Tang X. 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front Plant Sci.* 6: 902. doi: 10.3389/fpls.2015.00902.
- Syu YY, Hung JH, Chen JC, Chuang HW. 2014. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiol Biochem.* 83: 57-64. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.07.010.
- Thangavelu RM, Gunasekaran D, Jesse MI, Riyaz SUM, Sundarajan D, Krishnan K. 2018. Nanobiotechnology approach using plant rooting hormone synthesized silver nanoparticle as “nanobullets” for the dynamic applications in horticulture – An *in vitro* and *ex vitro* study. *Arab. J. Chem.* 11: 48-61. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.09.022
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: Research0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JA, Gomez KA. 1976. *Laboratory Manual for Plant Physiological Studies of Rice*. 3rd. Ed. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.

CONCLUSIONES GENERALES

La aplicación de AgNPs a dosis de 40 a 120 mg L⁻¹ puede inducir la germinación en semillas de arroz Morelos A-98, aplicaciones de 80 y 120 mg L⁻¹ de AgNPs promueven el crecimiento inicial de plántulas siendo 80 mg L⁻¹ AgNPs la concentración idónea para el cultivar Morelos A-98, lo que se pueden reducir los costos o el tiempo de producción en el establecimiento de almácigo.

El uso de AgNPs durante el desarrollo vegetativo de las plantas de arroz, la aplicación disminuyó las diferentes variables de crecimiento medidas, aunque aumentó indicadores fotosintéticos, y favoreció la concentración y acaumulacion de algunos nutrimentos esenciales y de prolina.

Vástagos de plantas de arroz expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) pueden producir moléculas de RNA de buena calidad, que pueden servir de moldes para la síntesis de cDNA.

De los genes de referencia probados, el que mostró mayor estabilidad (menor valor de M) para este estudio fue el *Factor de elongación 1 α* ($EF1\alpha$).

De 17 genes *NAC* probados en este estudio, cinco de ellos mostraron expresión diferencial en plantas tratadas con AgNPs respecto a plantas control. De estos cinco genes expresados diferencialmente, cuatro de ellos mostraron inducción y uno de ellos mostró represión de su expresión en presencia de AgNPs. De los cuatro genes sobre expresados, uno de ellos también mostró represión de su expresión con la menor dosis de AgNPs probada.

Se destaca que este es un estudio pionero que por primera vez demuestra que los genes *NAC* también responden a la presencia de AgNPs. Dada la multifuncionalidad de estos genes en la fisiología vegetal, resultará interesante continuar esta línea de investigación para asociar las respuestas aquí observadas con otras de naturaleza morfológica, bioquímica y fisiológica, que ayuden a tener una mejor estructura de la dinámica de respuestas de las plantas a la presencia de nanopartículas de plata en el medio.