



Dirección de Investigación
Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Form fields: Unidad: Saltillo, División: Agronomía, Departamento: Botánica, Tema estratégico (ANA/PEP): Hacer más eficiente la aplicación de fertilizantes foliares mediante biomoléculas y nanotecnología, Línea de investigación: Sistemas de producción en la agricultura protegida, Título del proyecto: Aplicación de nanopartículas de selenio para inducir capacidad antioxidante y tolerancia a estrés en hortalizas, Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000) \$75,000, Tipo de investigación: Básica, Aplicada X, Tecnológica, e-mail del responsable Juma841025@hotmail.com, Vinculación: Si, No X, Fondos concurrentes: Cooperante(s): Entidad (es): Coahuila, Municipio (s): Saltillo, Localidades: A realizar durante el(los) año(s): 2018

Table with 5 columns: Participantes, Adscripción (Clave Depto.), Expediente No., Firma. Rows include Responsable (Dr. Antonio Juárez Maldonado), Colaborador (Dra. Susana González Morales), Colaborador (Dr. Adalberto Benavides Mendoza), Colaborador (Dr. Armando Robledo Olivo), Colaborador (Dra. Hortensia Ortega Ortíz), Colaborador (Dr. Gregorio Cadenas Pliego), Tesista (Mónica Carolina Morales Espinoza), Tesista (Tomasa Quiterio Gutiérrez).

Form fields: Vo. Bo., Autoriza, Firma y sello, Nombre: Dra. Silvia Yudith Martínez Amador, Jefe de Departamento; Dr. Armando Robledo Olivo, Subdirector de Programación y Evaluación

Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Depto. de Botánica



## Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto	Presupuesto solicitado:
Aplicación de nanopartículas de selenio para inducir capacidad antioxidante y tolerancia a estrés en hortalizas	75000

### 2.- Introducción

Actualmente las partículas de 1 a 100 nanómetros de tamaño se están utilizando cada vez más para una variedad de propósitos clínicos y comerciales (Somasundaran *et al.*, 2010), estos avances han pavimentado el camino para posibles aplicaciones en la agricultura y la industria alimenticia, ya que proporcionan una mejor alternativa y estrategia de protección de los cultivos prometedoras, pero a pesar de estas características, el uso de la nanotecnología es aún limitada, debido a la falta de datos para la adecuada evaluación de su toxicidad (Anarayanan *et al.*, 2013). En comparación con los materiales a granel, las NPs pueden ser más tóxicas y/o beneficiosas, ya que tienen la capacidad potencial de pasar la membrana celular de la planta debido a su tamaño (Adhikari *et al.*, 2013). Recientemente, algunos trabajos de investigación han demostrado que las NPs Cu se depositan en las células de la raíz y hoja, además, se acumulan en los tejidos de la planta (Shi *et al.*, 2014), incrementan la actividad enzimática de catalasa (CAT) y disminuyen la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) en lechuga (Trujillo-Reyes *et al.*, 2014). Las NPs SiO<sub>2</sub> promueven la actividad enzimática SOD y ácido indolacético (IAA) en algodón y se encuentran presentes en la savia del xilema y raíz y son transportadas desde la raíz hacia los brotes (Nhan-Le *et al.*, 2014).

También se ha demostrado que el máximo crecimiento de plántulas de soya y garbanzo fue a 100 y 60 ppm con NPs Cu (Adhikari *et al.*, 2012), en arroz a 40 y 5 ppm con NPs de silicio y molibdeno, respectivamente (Adhikari *et al.*, 2013), sin embargo, más allá de estas concentraciones se inhibe el crecimiento y se atribuye a la acumulación y captación de las nanopartículas en las raíces. En este sentido, se propone el siguiente trabajo de investigación con los siguientes objetivos. El uso de fertilizantes suplementados con Se es un proceso muy eficaz que favorece la acumulación de Se en las plantas, mejorando incluso el desarrollo de la misma; sin embargo, el crecimiento de la planta puede verse reducido por mecanismos de retroalimentación cuando la concentración de Se es demasiado elevada. El selenio es un elemento esencial para los seres vivos, estando su esencialidad relacionada con selenoproteínas y selenoamino ácidos. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios relacionados con el selenio se centraban en dichos compuestos, sin embargo en los últimos años, y con el desarrollo de la nanotecnología, las nanopartículas de selenio (SeNPs), han generado un notable interés debido a sus excelentes propiedades biológicas y baja toxicidad (Peng *et al.* 2007, Li *et al.* 2010). Por otra parte, las SeNPs poseen un alto efecto frente a radicales oxidantes, como ha quedado demostrado en distintos estudios *in vitro* (Gao *et al.* 2014). Las interesantes propiedades de las nanopartículas de selenio (SeNPs) ha hecho que durante estos últimos diez años hayan aparecido multitud de trabajos relacionados tanto con su síntesis (Z. Chen *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009; Bai *et al.* 2008) como con sus aplicaciones.

### Objetivos

#### OBJETIVO GENERAL

Conocer las respuestas bioquímicas de inducción de capacidad antioxidante y resistencia al estrés en tomate tratado con NPs-Se y expuestas a diferentes condiciones de estrés abiótico.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes concentraciones de NPs-Se y su efecto sobre la acumulación de otros minerales en los tejidos de plantas de tomate.
- Describir las variables morfológicas y la micromorfología epidérmica de las plantas tratadas con NPs-Se en y sometidas a estrés bajo distintas condiciones de salinidad.
- Determinar la capacidad de antioxidantes y su efecto en la inducción de resistencia a estrés salino en plantas de tomate



La aplicación de NPs-Se inducirá mayor acumulación de compuestos antioxidantes en las plantas de tomate, además de que incrementará la capacidad de tolerar el estrés abiótico

### 3.-Revisión de Literatura

#### **Nanotecnología (NT)**

La nanotecnología es un término genérico y en evolución que comprende el desarrollo de muchos productos y procesos, con la característica común de la escala nanométrica. Esta escala va desde 1 nm hasta los 100 nm. Para que una partícula pertenezca a esta escala debe tener dimensiones nanométricas en más de una de sus dimensiones (Nowack, B. y Bucheli, T., 2007). La nanotecnología se presenta como una nueva área de investigación que permite estudiar fenómenos que ocurren a nivel atómico y molecular, su importancia radica en el mundo nanométrico ya que los materiales pueden adquirir o realizar propiedades diferentes a las que se tienen a escala macroscópica (Mendoza y Rodríguez, 2007). La rápida evolución y crecimiento de la nanotecnología se ha convertido en una pieza clave para el fomento de la innovación competitiva, la aparición de nuevos negocios y perspectivas de progreso para muchos sistemas económicos. Representan una revolución de dispositivos con precisión atómica, a través del tratamiento de átomos y moléculas, teniendo aplicaciones en medicina y diversos tipos de industria como la automoción, textil y alimentaria entre otras (Ávalos et al., 2013). En la actualidad, el inventario de productos para el consumo indica que hay 1814 productos que contienen nanomateriales (Vance et al., 2015). La aplicación de la nanotecnología en los sectores agrícola y alimentario es relativamente reciente en comparación con su uso en la administración de fármacos y en los productos farmacéuticos (García et al., 2010). Al igual que en otros sectores, la nanotecnología promete revolucionar toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el procesamiento y almacenamiento de hortalizas y otros productos (Lili et al., 2011). Estas aplicaciones se están estudiando, desarrollando e incluso utilizando en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos, desde la agricultura, el procesamiento y embalaje de alimentos, los proveedores/minoristas y por último los consumidores (Berekaa, 2015).

#### **Nanopartículas (NPs)**

Las Nanopartículas poseen dimensiones nanométricas en sus tres dimensiones, mientras que los términos material nanoestructurado y nanomaterial son más generales y se aplican a materiales cuya fabricación, o cuyas dimensiones sean controladas a nivel nanométrico. Hay tres tipos de Nanopartículas: las naturales, como las que se producen en erupciones volcánicas; las incidentales, como las emisiones de la combustión en motores; y las fabricadas, generadas a propósito con una finalidad (Medina, M. et al., 2015). Por lo que su diversidad es muy extensa. Estas pueden ser fabricadas a través de dos métodos principales; "top-down" moliendo materiales a granel o "bottom-up" mediante la síntesis química o auto-ensamblaje de compuestos más pequeños (Forough y Farhadi, 2010; Pal et al., 2011). El interés de esta tecnología radica en el hecho de que su pequeño tamaño aporta propiedades físicas y químicas que difieren significativamente de las que presenta el mismo material a mayor escala. Por esta capacidad ventajosa que les otorga este distinto comportamiento, las NPs pueden formar parte de la composición de productos y aportarles nuevas propiedades. Sin embargo, esta diferencia de comportamiento puede igualmente inducir riesgos potenciales (Maurer-Jones et al., 2013). Los NMs inorgánicos constan de metales, principalmente NPs de metales oxidados cuya aplicación mayoritaria consiste en el desarrollo de envasado de alimentos. Entre los metales más usados encontramos las NPs de plata, hierro, calcio y magnesio, selenio, dióxido de silicio y dióxido de titanio (Weir et al., 2012).

#### **Nanopartículas de Selenio (SeNPs)**

El nivel de Se en agricultura (cereales) está directamente relacionado con su nivel en el suelo de cultivo, quedando su biodisponibilidad condicionada por las condiciones fisicoquímicas del mismo como: pH, potencial redox, salinidad y presencia de materia orgánica (Intawongse & Dean 2006). La necesidad de alcanzar los valores necesarios de selenio en la dieta, ha impulsado el campo de investigación relacionado con el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos con este elemento y con procesos de biofortificación de cultivos (Rayman 2005). El uso de fertilizantes suplementados con Se es un proceso muy eficaz que favorece la acumulación de Se en las plantas, mejorando incluso el desarrollo de la misma; sin embargo, el crecimiento de la planta puede verse reducido por mecanismos de retroalimentación cuando la concentración de Se es demasiado elevada. El selenio es un elemento esencial para los seres vivos, estando su esencialidad relacionada con selenoproteínas y selenoamino ácidos. Hasta la fecha, la



mayoría de los estudios relacionados con el selenio se centraban en dichos compuestos, sin embargo en los últimos años, y con el desarrollo de la nanotecnología, las nanopartículas de selenio (SeNPs), han generado un notable interés debido a sus excelentes propiedades biológicas y baja toxicidad ( Peng et al. 2007, Li et al. 2010). Por otra parte, las SeNPs poseen un alto efecto frente a radicales oxidantes, como ha quedado demostrado en distintos estudios in vitro (Gao et al. 2014). Las interesantes propiedades de las nanopartículas de selenio (SeNPs) ha hecho que durante estos últimos diez años hayan aparecido multitud de trabajos relacionados tanto con su síntesis (Z. Chen et al. 2008; Chen et al. 2009; Bai et al. 2008) como con sus aplicaciones.

#### 4.- Procedimiento Experimental

El presente trabajo se llevará a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Utilizando como material experimental plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) híbrido El Cid F1, con hábito de crecimiento indeterminado que serán ubicadas en el invernadero del Departamento de Horticultura en macetas de 10L, con sustrato peat mos y perlita, proporción 1:1, V/V.

El experimento se desarrollara en dos etapas: Etapa I. En esta etapa se determinarán las dosis de nanopartículas de selenio que den mejores resultados conforme a la cantidad de compuestos de interés, como complejos enzimáticos, antioxidantes, además de las variables agronómicas como altura de la planta, diámetro del tallo, número de racimos por planta, peso fresco de frutos, y finalmente peso fresco y seco de las plantas. Se realizarán dos experimentos, 1) uno constará de tres vías de aplicación y cuatro dosis de NPs-Se y 2) el segundo será la aplicación de NPs-Se en combinación con NPs-Cu. Para ambos casos se establecerá el experimento en un diseño factorial completamente al azar. El experimento 1 será la aplicación vía sustrato, drench y foliar de 4 dosis de NPs-Se (0, 1, 10 y 20 mg/L). El segundo experimento consistirá en 4 dosis de NPs-Se (0, 1, 10 y 20 mg/L) y 4 dosis de NPs-Cu (0, 25, 50 y 250 mg/L).

En la etapa II se aplicaran los tres mejores tratamientos de cada experimento que resulten de la etapa I. Serán dos experimentos a los que se inducirá estrés salino (75 mM de NaCl), para posteriormente evaluar las variables morfológicas y bioquímicas para verificar los efectos.

En ambos ciclos se determinará la morfología (altura, diámetro de tallo, número de hojas), biomasa fresca y seca, y la micromorfología epidérmica (frecuencia estomática e índice estomático abaxial y adaxial) a los 10, 20 y 40 días después del trasplante (ddt). Adicionalmente el contenido de los minerales será determinado usando un ICP-plasma. Las plantas serán colectadas y serán secadas, molidas y sometidas a digestión ácida para detectar la presencia de cobre y otros elementos en las plantas tratadas.

Además se medirán la acumulación de fenoles, capacidad antioxidante (ABTS y DPPH), vitamina C. Serán determinados utilizando técnicas colorimétricas y HPLC en muestras colectadas del primer racimo, colocándolas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C. La actividad enzimática de catalasa (CAT) será cuantificada con un método espectrofotométrico (Ramos *et al.*, 2010), la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976), Superóxido dismutasa (SOD): La extracción de la enzima, se efectuará por el método establecido por Ramos *et al.* (2010) y la actividad enzimática mediante el kit para determinación de sigma 19160. La Glutación peroxidasa (GPX) se medirá utilizando el método modificado por Flohé y Günzler (1984) usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato.

Adicionalmente se determinará la calidad nutricional de los frutos de tomate, se utilizarán muestras de frutos colectados del primer racimo y en grado de color 4 de acuerdo con el USDA. Se determinará el índice refractométrico, el pH, el contenido de vitamina C, licopeno, y carotenoides totales. También se medirán el número de frutos, peso promedio de frutos, número de racimos florales, que nos permita determinar rendimiento.

Para el análisis estadístico se realizara un ANOVA y comparación de medias, LSD Fisher (P≤0.05), en el programa estadístico INFOSTAT.

#### Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Desarrollo experimental		X	X	X	X	X						
Aplicación de NPs			X	X	X	X						
Evaluación de tratamientos				X	X	X						



Determinaciones en Laboratorio			X	X	X								
Análisis de datos							X	X	X				
Redacción de manuscrito									X	X			
Redacción de Tesis										X	X		
Presentación de Grado													X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Desarrollo experimental	X	X										
Determinaciones en Laboratorio		X	X									

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2017	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

#### 5.-Productos Esperados

- 2 Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura
- 2 Artículos enviados a revistas indizadas
- 2 Tesis de Licenciatura

#### 6.-Literatura Citada

- Ávalos, A, Haza, AI, Mateo, D y Morales P. 2013. Aplicaciones y riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas de plata. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 1-23.
- Berekaa MM. 2015. Nanotechnology in Food Industry; Advances in Food processing, Packaging and Food Safety. Int J Curr Microbiol App Sci, 345-357.
- EPA. 2007. Nanotechnology white paper. Washington, DC, USA. 132 p.
- Flores, F.B., Sánchez-Bel, P., Estan, M.T., Martínez, R.M.M., Moyano, E., Morales, B., Campos, J.F., García, A.J.O., Egea, M.I., Fernández, G.N., Romojaro, F., Bolarin, M. C. 2010 The effectiveness of grafting to improve tomato fruit quality. Scientia Horticulturae. 125:211-217.
- Foladori, G., 2008. Nanotecnologías en a alimentación y agricultura, Universidad de la república.
- Forough, M y Farhadi, K. 2010. Biological and green synthesis of silver nanoparticles. Turkish J Eng Env Sci 34: 281–287.
- Garcia M, Forbe T, Gonzalez E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. Food Science and Technology (Campinas). 2010; 573–581.
- He, Z., He, C., Zhang, Z., Zou, Z., Wang, H. 2007. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. Colloids Surf. B. Biointerfaces. 59:128-133.
- Hochella, M. F.; Lower, S. K.; Maurice, P. A.; Penn, R. L.; Sahai, N.; Sparks, D. L. and Twining, B. S. 2008. Nanominerals, mineral nanoparticles, and Earth systems. Science. 319(5870):1631- 1635.
- Lili, H., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against Botrytis cinerea and Penicillium expansum. Microbiological Research, 166: Pages 207–215.

- Martinez-Villavicencio, N., C.V. Lopez-Alonzo, M. Basurto-Sotelo, R. Perez-Leal. 2011: efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Tecnociencia chihuahua* 5(3):156-161.
- Maurer-Jones, MA, Gunsolus, IL, Murphy, CJ y Haynes CL. 2013. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Anal Chem* 85(6): 3036-3049.
- Medina M., Miguel E., Luis E. Galván R. y Rosa E. Reyes G. Las nanoparticulas y el medio ambiente. 2015, ISSN 1316-4821, Vol. 19, N° 74.
- Mendoza, G. y Rodríguez, J. (2007) La Nanociencia y la Nanotecnología: una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos* 29: 161-186.
- Munns, R. Y Rawson, H. M. (2008). Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Aust. J Plant Physiol.*, vol. 26, p.459-469
- Munns, R. y Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, vol. 59, p. 651-681.
- Nowack, B. y Bucheli, T. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150 (2007): 5-22.
- Reyes, Y., Mazorra, L.M., Martínez, L., Y Nuñez, M. 2010: Efecto del análogo de brasinoesteroide (biobras16) en la germinación y el crecimiento inicial de las plantas de dos variedades de tomate en condiciones de estrés salino cultivos tropicales. 31 (3).
- Sam, O.; Ramirez, C.; Coronado, M. J.; Testillano, P. S. y Risueño, M. del C. Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: leaf organization and cell ultrastructure. *Biologia Plantarum*, 2003/4, vol. 47, no. 3, p. 361-366.
- Vance, ME, Kuiken, T, Vejerano, EP, McGinnis, SP, Hochella, MF, Rejeski, D y Hull MS. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6:1769-1780.
- Weir, A, Westerhoff, P, Fabricius, L, Hristovski, K y van Goetz N. 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 46: 2242-2250.
- Yeo, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant physiology. *J. Exp. Bot.*, 1998, vol. 49, p. 915-929.
- Zhu, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, vol. 53, p. 247-73.